THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité
Océanologie Biologique et Environnement Marin

Présentée par
Séverine JACQUET

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI**

Sujet de la thèse

IMPACT DES APPORTS EN NUTRIMENTS SUR LE RESEAU TROPHIQUE PLANCTONIQUE DU LAGON SUD-OUEST DE NOUVELLE-CALEDONIE

Thèse dirigée par Jean-Pascal TORRETON

Soutenue le 30 Mars 2005, devant le jury composé de :

M.	L. LEGENDRE	Directeur de Recherche, CNRS Villefranche sur Mer	Rapporteur
M.	P. NIVAL	Professeur, Université Paris VI	Examinateur
M.	F. RASSOULDZADEGAN	Directeur de Recherche, CNRS Villefranche sur Mer	Examinateur
M.	P. SERVAIS	Professeur, Université Libre de Bruxelles	Rapporteur
M.	J-P TORRETON	Directeur de Recherche, IRD Nouméa	Directeur de Thèse
Mme	F. VAN WAMBEKE	Chargé de Recherche, CNRS Marseille	Examinateur

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Camélia du Centre IRD de Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Avant de se lancer dans le travail de recherche proprement dit, je tenais tout d'abord à remercier quelques personnes qui m'ont permises de réaliser cette thèse :

Je tiens à remercier en premier lieu, Christian Colin, directeur du centre IRD de Nouméa, pour m'avoir accueillie ces quelques années dans votre centre.

Je remercie Renaud Fichez, de m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche CAMELIA, merci Renaud d'avoir répondu de manière positive à ce mail où je te demandais un stage de DEA de quelques mois, qui se sont ensuite transformés en une thèse de quelques années.

De simples remerciements, ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers Jean-Pascal Torréton, mon directeur de thèse, qui me transmet sa passion pour la recherche depuis mon DEA. Merci Jean-Pascal pour ton encadrement qui je peux te le dire maintenant était très envié par mes collègues en thèse…

Je tiens à remercier Louis Legendre et Pierre Servais de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Ces mêmes remerciements s'adressent à France VanVambeke, Paul Nival et Fereidoun Razzouldzadegan d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Alain Lapetite, technicien de l'UR CAMELIA qui a toujours été à mes côtés pendant mon travail en mer et en laboratoire. Merci Alain, pour ton aide continuelle au cours de ces années, je te dois beaucoup. Promis un jour je ferais la Transcal' !!!

Tous mes remerciements vont à Sam Tereua et Miguel Clarque, capitaines du Coris, merci pour votre bonne humeur quelque que soient les conditions météo, et merci d'avoir accepté les sorties en mer au levé du soleil…Merci aussi à l'équipage de l'Alis, et en particulier à son capitaine Raymond Proner. Merci d'avoir commandé des baleines !

J'aimerais adresser une reconnaissance toute particulière à Olivier Pringault et Dominique Ponton, qui ont toujours su m'écouter (et ça peut être long de m'écouter…) : Olivier, tu es venu me chercher à l'aéroport quand je suis revenue en thèse, ce devait être le signe que tu allais m'épauler tout au long de celle-ci. Un merci du fond du cœur pour ta porte ouverte et tes conseils pour avancer dans le monde de la recherche et dans la vie. Dominique, merci pour tes conseils en statistique, les discussions toujours très intéressantes, parfois perturbantes mais toujours enrichissantes, dommage va falloir que je me trouve un nouveau binôme plongée qui fait de la photo…

Je ne peux faire des remerciements aux personnes qui m'ont apportée beaucoup au cours de cette thèse sans nommer Mme Martine Rodier, « Elle t'a appelée Nathalie ? Moi oui… ». Merci martine pour ta bonne humeur et tes conseils très judicieux en matière de chimie marine.

Thanks a lot to Emma Rochelle-Newall, for all linguistic corrections and the lot of advices about post-doc positions and to support me during the last moment of the writing.

Je ne veux oublier personne de l'équipe CAMELIA, Benjamin « Ben' », Pascal et Sylvain « les douillons », Sandrine, Philippe, Christophe, Héléna, Aymeric, Vincent, Romain, merci pour ces 4 années en votre compagnie.

Cette thèse a aussi pu se faire avec l'aide de personnes que je tiens à remercier, pour avoir toujours été présentes pour répondre à mes tracas administratifs, informatiques ou techniques, en particulier Marie-Noëlle, Elisabeth, Catherine, Georges, Jean-Yves.

Je tiens à remercier les métropolitains qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires lors des mes passages,
A Pau, je remercie Pierre Caumette, directeur du laboratoire d'Ecologie Moléculaire, de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Un grand merci à Robert Duran pour toute son aide et sa patience dans mon apprentissage des techniques de biologie moléculaire.
A Perpignan, tous mes remerciements vont à Bruno Delesalle, merci de m'avoir fait découvrir le vaste monde de la taxonomie du phytoplancton et pour ton humanité.
A Montpellier, merci à Marc Troussellier pour son accueil et sa disponibilité.

Merci à Jean Blanchot pour les analyses de picophytoplancton en cytométrie de flux et pour m'avoir permis de participer à la « grande messe » des chercheurs des milieux récifaux coralliens, l'ICRS à Okinawa en juin 2004.

Je tenais à remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de cette thèse tant à l'IRD Nouméa que dans les laboratoires métropolitains et qui sont devenus des amis, Daouda « mon africain préféré », Marion «fakatai ite api e tahi Uvea», Nathalie « ce cycle de 48 heures nous lie à jamais », Nico « allé Nico ! (avec la voix de micka) », Violaine « rien de telle qu'une randonnée avec une géologue ! », Rafa «l'émotivité est notre atout ! », Isa « tu l'as ouvert ton resto ? », Juju et Nono « les brestois en folie », Aude et Odile « Bio Mol Team ».

Mes remerciements les plus forts reviennent à ma famille pour leur confiance, leur amour et leur patience pour ces longues absences au bout du monde.

Enfin, merci à mon Wallis du bout du monde, qui a su s'adapter à merveille à quelqu'un d'une autre culture et qui parle de choses aussi étranges que le phytoplancton ou bien la chlorophylle a… Je te dois beaucoup.

Ce travail a bénéficié de financements du Programme National sur l'Environnement Côtier (PNEC, Chantier Nouvelle-Calédonie), du Secrétariat à l'Outre-Mer sur l'appel d'offre « Biodiversité », du programme ZoNéCo sur l'opération « Indicateurs de l'état de l'environnement », ainsi que d'une allocation de recherche nationale attribuée par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

CHAPITRE I - INTRODUCTION GENERALE 1

I.1 - LE RESEAU TROPHIQUE MICROBIEN ET L'EUTROPHISATION 1
I.1.1 - De la chaîne alimentaire classique au réseau trophique microbien 1
I.1.1.1 - La chaîne alimentaire classique 1
I.1.1.2 - La boucle microbienne 1
I.1.1.3 - Le réseau trophique microbien 3
I.1.2 - L'eutrophisation 8
I.1.2.1 - Définition générale 8
I.1.2.1.1 - L'eutrophisation en milieu marin 8
I.1.2.1.2 - Nutriments et éléments limitants 9
I.1.2.1.3 - Limitation nutritive 11
I.1.2.1.4 - Apports de matière organique et de nutriments dans les écosystèmes côtiers 13
I.1.2.2 - Eutrophisation et réseau trophique microbien 15

I.2 - CADRE DE L'ETUDE 17
I.2.1 - Description geographique 17
I.2.1.1 - La Nouvelle-Calédonie 17
I.2.1.2 - Le lagon sud-ouest 17
I.2.1.3 - Hydrodynamisme local 19
I.2.2 - Apports par le systeme benthique 20
I.2.2.1 - Les récifs barrières ou frangeants 20
I.2.2.2 - Interface benthos-pelagos 21
I.2.3 - Apports terrigènes 23
I.2.3.1 - Hydrologie des cours d'eau 23
I.2.3.2 - Caractéristiques des apports terrigènes 24
I.2.4 - Apports anthropiques 27
I.2.5 - Un lagon sous différentes influences 29

I.3 - OBJECTIFS DE L'ETUDE 30

CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES 35

II.1 - STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE 35
II.1.1 - Echantillonnage spatial 35
II.1.1.1 - Choix des sites d'échantillonnage 35
II.1.1.2 - Fréquence d'échantillonnage 37
II.1.1.3 - Profondeur de prélèvement 37
II.1.2 - Echantillonnage temporel 38
II.1.2.1 - Choix des sites d'échantillonnage 38
II.1.2.2 - Fréquence d'échantillonnage 38
II.1.2.3 - Profondeurs de prélèvement 39

II.2 - COMPARTIMENT PHYTOPLANCTONIQUE 40

II.2.1 - Chlorophylle a *40*
II.2.2 - Production Primaire *40*
II.2.2.1 - Protocole de mesure 40
II.2.2.2 - Calcul de la production primaire 41
II.2.2.3 - Estimation de la concentration des carbonates 42
II.2.2.4 - Reproductibilité de la mesure 42
II.2.3 - Abondance et structure des communautés phytoplanctoniques *43*
II.2.3.1 - Dénombrement des populations picophytoplanctoniques 43
II.2.3.2 - Dénombrement des populations microphytoplanctoniques 43

II.3 - COMPARTIMENT BACTERIEN HETEROTROPHE 45
II.3.1 - Abondance et Biomasse bactérienne *45*
II.3.1.1 - Microscopie à épifluorescence 45
II.3.1.2 - Cytométrie en flux 45
II.3.1.3 - Comparaison des deux techniques 46
II.3.1.4 - Interprétation en biomasse 46
II.3.2 - Production bactérienne *47*
II.3.2.1 - Principe 47
II.3.2.2 - Adaptation aux conditions lagonaires 48
II.3.2.3 - Protocole de routine 57
II.3.2.4 - Calcul de la production bactérienne 59
II.3.3 - Structure des communautés bactériennes *61*
II.3.3.1 - Principe de la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 61
II.3.3.2 - Protocole 63

II.4 - VARIABLES DESCRIPTIVES DU MILIEU 67
II.4.1 - Nutriments *67*
II.4.1.1 - Ammonium (NH_4^+) 67
II.4.1.2 - Nitrates, nitrites, phosphates (NO_3^-+NO_2^-, PO_4^{2-}) 67
II.4.1.3 - Silicates 67
II.4.1.4 - Azote et phosphore organique dissous 68
II.4.1.5 - Carbone et azote organique particulaires 68
II.4.1.6 - Phosphore organique particulaire 68
II.4.3 - Variables physiques et météorologiques *68*
II.4.3.1 - Caractérisation de l'eau prélevée 68
II.4.3.2 - Vent 69
II.4.3.3 - Lumière 69

CHAPITRE III - DYNAMIQUE TEMPORELLE DES COMMUNAUTES PLANCTONIQUES 71

III.1 - RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS 71
III.2 - INTRODUCTION 72
III.3 - MATERIAL AND METHODS 75
III.3.1 - Study site and sampling. *75*
III.3.2 - Water column physical description. *75*

III.3.3 - Meteorological variables. *77*
III.3.4 - Bacterial biomass and production *77*
III.3.5 - Phytoplanktonic abundance and production *78*
III.3.6 - Nutrients *79*

III.4 - RESULTS 81
III.4.1 - Diel cycles *81*
III.4.1.1 - Biological parameters 81
III.4.1.2 - Nutrients 83
III.4.2 - Day-to-day variations *85*
III.4.3 - Seasonal variations *85*
III.4.3.1 - Meteorological conditions 85
III.4.3.2 - Hydrological description 86
III.4.3.3 - Nutrients 89
III.4.3.3.1 - Mineral 89
III.4.3.3.2 - Elemental ratios 91
III.4.3.3.3 - Organic 91
III.4.3.4 - Seasonal variations of biological parameters 93

III.5 - DISCUSSION 97
III.5.1 - Daily and short term representativity of measurements *97*
III.5.2 - Seasonal variations *98*
III.5.2.1 - 2002-2003 representativity and seasonal variations 98
III.5.2.2 - Homogeneity of water column 99
III.5.2.3 - Trophic status of the two sites throughout the year 99
III.5.2.4 - Limiting factor 101
III.5.2.5 - Environmental influences 102
III.5.2.6 - Relationships between bacterial and primary production 105
III.6 - CONCLUSION 107

CHAPITRE IV - REPONSES DES COMMUNAUTES PLANCTONIQUES AUX ACCROISSEMENTS LOCAUX EN NUTRIMENTS 109

IV.1 - INTRODUCTION 110
IV.2 - ECHANTILLONNAGE ET VARIABLES MESUREES 111
IV.3 - RESULTATS 113
IV.3.1 - Conditions trophiques *113*
IV.3.1.1 - Salinité, température 113
IV.3.1.2 - Gradients d'enrichissements 113
IV.3.1.3 - Etendue des conditions trophiques 117
IV.3.2 - Limitation nutritive *121*
IV.3.2.1 - Limitation nutritive par les concentrations et ratios 121
IV.3.2.2 - Limitation nutritive par les relations statistiques *in situ* 121
IV.3.3 - Réponses des communautés planctoniques aux enrichissements locaux *123*
IV.3.3.1 - Evolution de la contribution des classes de taille phytoplanctonique à la biomasse et activité totale 123
IV.3.3.2 - Taux de croissance phytoplanctonique 123

IV.3.4 -Importance de la production bactérienne et de la demande bactérienne en carbone comparées à la production primaire *124*
IV.4 - DISCUSSION 125
IV.4.1 - Gamme de conditions trophiques *125*
IV.4.2 - Limitation nutritive *125*
IV.4.3 - Réponses des communautés bactérienne et phytoplanctonique aux accroissements locaux en ressources nutritives *129*
IV.4.4 - Production bactérienne vs. production primaire *132*
IV.5 - CONCLUSION 134

CHAPITRE V - REPONSES DES COMMUNAUTES PHYTOPLANCTONIQUES AUX APPORTS EN NUTRIMENTS 135

V.1 - RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS 135
V.2 - INTRODUCTION 136
V.3 - MATERIAL AND METHODS 139
V.3.1 - Study area *139*
V.3.2 - Sampling *139*
V.3.3 - Nutrient analyses *140*
V.3.4 - Phytoplankton abundance and composition *141*
V.3.5 - Statistical tests *142*

V.4 - RESULTS 143
V.4.1 - Physical characteristics *143*
V.4.2 - Nutrients *143*
V.4.3 - Phytoplankton *145*

V.5 - DISCUSSION 152
V.5.1 - Limiting nutrient *152*
V.5.2 - Relationships between nutrients and phytoplankton variables *155*
V.5.2.1 - Size classes 155
V.5.2.2 - Picophytoplankton groups 156
V.5.2.3 - Microphytoplankton groups 157
V.5.2.4 - Comparison with previous studies 158

CHAPITRE VI - EVOLUTION SPATIALE ET TEMPORELLE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES 161

VI.1 - RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS 161
VI.2 - INTRODUCTION 162
VI.3 - MATERIALS AND METHODS 165
VI.3.1 - Study area and sampling stations *165*
VI.3.2 - Spatial sampling *165*
VI.3.3 - Temporal sampling *166*
VI.3.4 - Chlorophyll a, Bacterial Abundance and production *166*

VI.3.5 - T-RFLP bacterial community analysis *167*
VI.3.6 - Reproducibility of T-RFLP fingerprinting from complex bacterial communities *169*
VI.3.7 - Data analysis *169*

VI.4 -RESULTS 171
VI.4.1 - Free-living vs attached bacteria *171*
VI.4.2 - Spatial variations *171*
VI.4.2.1 - Physical, chemical and biological characteristics of the sampling sites 171
VI.4.2.2 - Quantitative and qualitative aspects of the spatial distribution of attached and free-living bacteria 175
VI.4.3 - Temporal variations *182*
VI.4.3.1 - Physical, chemical and biological characteristics of the survey site 182
VI.4.3.2 - Quantitative and qualitative aspects of the temporal distribution of attached and free-living bacteria 185

VI.5 - DISCUSSION 189
VI.5.1 - Differences between free-living and particle-attached bacteria *189*
VI.5.2 - Spatial variations *190*
VI.5.3 - Temporal dynamics *193*
VI.5.4 - Diversity and the use of T-RFLP to fingerprint bacterial assemblages *194*

VI.6 -CONCLUSIONS 197

CHAPITRE VII - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 199

BIBLIOGRAPHIE 209

ANNEXES 227

En Français

AB	Abondance Bactérienne
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Chl.*a*	Chlorophylle *a*
MOD	Matière Organique Dissoute
NBact	Abondance Bactérienne
NID	Azote Inorganique Dissous
NH_4	Ammonium
NO_3+NO_2	Nitrate+Nitrites
NOD	Azote Organique Dissous
NOP	Azote Organique Particulaire
NOT	Azote Organique Total
NS	Non Significatif
PB	Production Bactérienne
PET	Particules Exopolymériques Transparentes
PO_4	Phosphate
POD	Phosphore Organique Dissous
POP	Phosphore Organique Particulaire
POT	Phosphore Organique Total
PP	Production Primaire
PPI	Production Primaire Intégrée
SiO_2	Silicates
SW	Sud-ouest
TCA	Acide TriChloroAcétique
TdR	^{3}H-Thymidine
µBact	Taux de croissance bactérien

En Anglais

BP	Bacterial Production
Chl.*a*	Chlorophyll *a*
CTD	Conductivity Temperature Depth
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	DesoxyriboNucleic Acid
DOM	Dissolved Organic Mater
DON	Dissolved Organic Nitrogen
DOP	Dissolved Organic Phosphate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
OTU	Operational Taxonomic Unit
PAR	Photosynthetically Active Radiation
PCR	Polymerisation Chain Reaction
PP	Primary Production
T-RFLP	Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
SW	South-West

Chapitre I

Figure I.1 - Chaîne alimentaire classique 1
Figure I.2 - Concept de la boucle microbienne 2
Figure I.3 - Schéma du réseau trophique microbien 4
Figure I.4 - Modèle de chaîne alimentaire pélagique et des flux de carbone via les virus 6
Figure I.5 - Premier modèle conceptuel de l'eutrophisation côtière. 8
Figure I.6 - Modèle conceptuel contemporain de l'eutrophisation côtière 10
Figure I.7 - Réseau trophique planctonique simplifié en conditions stables (A), avec des apports nutritifs en excès (B). 14
Figure I.8 - Carte de la Nouvelle-Calédonie et de sa position dans le Pacifique sud-ouest (A) Carte du lagon sud-ouest (B) 16
Figure I.9 - Courants de surface simulés 18
Figure I.10 - Caractérisation sédimentologique du lagon sud-ouest 21
Figure I.11 - Réseau hydrographique partie Sud de la Grande Terre 23
Figure I.12 - Carte de la composition des sédiments en carbonates 26
Figure I.13 - Le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Des zones sous différentes influences 28

Chapitre II

Figure II.1 - Stations échantillonnées dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie 36
Figure II.2 - Suivi hebdomadaire de la Chlorophylle *a* de 1979 à 1983 39
Figure II.3 - Modélisation (courbe Michaelienne) de l'incorporation de thymidine ($pM.h^{-1}$) en fonction de la concentration ajoutée (nM) 49
Figure II.4 – (A) Relations entre incorporation de TdR (dpm) et température (K en kelvin), (B) Détermination des constantes de l'équation d'Arrhenius 53
Figure II.5 - Abondance bactérienne et incorporation de thymidine au cours des étalonnages 54
Figure II.6 - Protocole de mesure de la production bactérienne 58
Figure II.7 - Structure secondaire modélisée du gène codant pour l'ARNr 16S 60
Figure II.8 - Protocole de la T-RFLP 62
Figure II.9 - Etapes d'amplification de la PCR 64
Figure II.10 - Différentes étapes de la T-RFLP 66

Chapitre III

Figure III.1 - Stations positions 76
Figure III.2 - (A) Chl.*a* concentration and (B) Bacterial production during a diel cycle at station M33, June 2003 81
Figure III.3 – (A) Bacterial production measured in M33 and N12 between April 11 and April 13, 2002. (B) Wind stress in $m^2 s^{-2}$ measured at "Faubourg Blanchot" Météo France station 82
Figure III.4 - NH_4, NO_3+NO_2 and PO_4 concentrations during a diel cycle at station M33, June 2003 83
Figure III.5 - (A) Wind speed projected on the 110° axis between 11/02/04 and 17/02/04 (B) Day-to-day variations of bacterial production and Chl.*a* at 3 m depth at station N12 84
Figure III.6 - Meteorological variables between April 02 and April 03. 86
Figure III.7 - Average vertical distribution of normalized CTD variables at stations M33 and N12 87
Figure III.8 - Temperature, salinity, turbidity, and Kd at stations M33 and N12 88
Figure III.9 - Nutrient concentrations at stations M33 and N12 90
Figure III.10 – (A) Total chlorophyll *a* concentrations at stations M33 and N12 between April 2002 and April 2004 (B) Percent contribution of different size classes to total Chl.*a* at stations M33 and N12 94
Figure III.11 - (A) Primary and bacterial productions at stations M33 and N12 between April 2002 and April 2003 (B) Percent contribution of each size-class to total PP at M33 and N12 96
Figure III.12 - Plot of log bacterial production (BP) versus log primary production (PP) at stations M33 and N12 104

Chapitre II

Tableau II.1 - Périodes d'échantillonnage des radiales 37
Tableau II.2 - Rapport de la radioactivité ^{3}H-thymidine retenue sur les membranes entre échantillons hydrolysés et non hydrolysés 50
Tableau II.3 - Constantes de l'équation d'Arrhenius pour la production bactérienne 53
Tableau II.4 - Production cellulaire nette, incorporation de TdR intégrée, et rapport de la production nette à l'incorporation de TdR 56
Tableau II.5 - Séquences des amorces ciblant le gène ADNr 16S 65

Chapitre III

Tableau III.1 - Overview of studies at different temporal scales in the SW lagoon of New Caledonia 74
Tableau III.2 - Summary of diel studies in the SW lagoon 80
Tableau III.3 - Variations of turbidity, Kd, nutrient concentrations, Chl.*a*, PP and BP between successive samplings from April 2002 to April 2003 92
Tableau III.4 – Seasonal variation of the primary limiting factor for phytoplankton 100

Chapitre IV

Tableau IV.1 - Structure de chaque radiale 114
Tableau IV.2 - Valeurs minimales, maximales et moyennes des variables physico-chimiques pour l'ensemble des radiales 117
Tableau IV.3 - Valeurs minimales, maximales et moyennes des variables biologiques pour l'ensemble des radiales 119
Tableau IV.4 - Coefficients de corrélation et degrés de signification des relations entre variables biologiques et nutriments minéraux dissous 120
Tableau IV.5 - Coefficient de corrélation et leur degré de signification entre les nutriments minéraux dissous 122
Tableau IV.6 - Corrélations partielles entre les variables biologiques et les phosphates, l'azote minéral dissous et les silicates 122
Tableau IV.7 - Coefficients de corrélation et leur degré de signification entre proportions de la chlorophylle *a* ou la production primaire dans différentes classes de taille et les nutriments minéraux dissous 123
Tableau IV.8 - Test d'égalité des espérances pour des observations non pairées entre les rapports production primaire/chlorophylle *a* (µ) pour chaque fraction de taille 124
Tableau IV.9 - Régressions linéaire de modèle II entre les Log Népériens de la production bactérienne et de la production primaire 125
Tableau IV.10 - Régressions linéaire de modèle II entre les Log Népériens de la demande bactérienne en carbone (DBC) et de la production primaire 126

Chapitre V

Tableau V.1 - Sampling period, number of stations sampled, and corresponding season. A transect is a set of 6 stations located from the coast to the open sea 140
Tableau V.2 – Spearman's rank correlations between data and station numbers 144
Tableau V.3 - List of the 144 microalgal taxa identified in the 135 samples and the area where they were found in the Southwest lagoon 149
Tableau V.4 - Percentage of samples in which nutrient ratios and concentrations suggest nutrient limitation 153
Tableau V.5 - Model II log-log regressions of Chl.*a* in size-classes and phytoplankton groups vs. DIN, NH_4 and (NO_3+NO_2) 154

Chapitre VI

Tableau VI.1 - Jaccard's coefficient (J) between free-living and particle-attached bacteria community structure along coast-lagoon transects in January 03, and between 22/05/02 and 172

11/03/03 at station M33
Tableau VI.2 - Physico-chemical and biological variables measured at 3 m depth along coast-lagoon transects 173
Tableau VI.3 - Community structure of free-living bacterioplankton along coast-lagoon transects 174
Tableau VI.4 - Community structure of particle-attached bacterioplankton along coast-lagoon transects 176
Tableau VI.5 - Community structure of free-living bacterioplankton at M33 station 184
Tableau VI.6 - Community structure of particle-attached bacterioplankton at M33 station 186
Tableau VI.7 - Number of TRFs found for total, free-living or particle-attached bacteria using fingerprinting techniques 196

CHAPITRE I

Introduction

CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE

I.1. LE RESEAU TROPHIQUE MICROBIEN ET L'EUTROPHISATION

I.1.1. DE LA CHAINE ALIMENTAIRE CLASSIQUE AU RESEAU TROPHIQUE MICROBIEN

I.1.1.1. La chaîne alimentaire classique

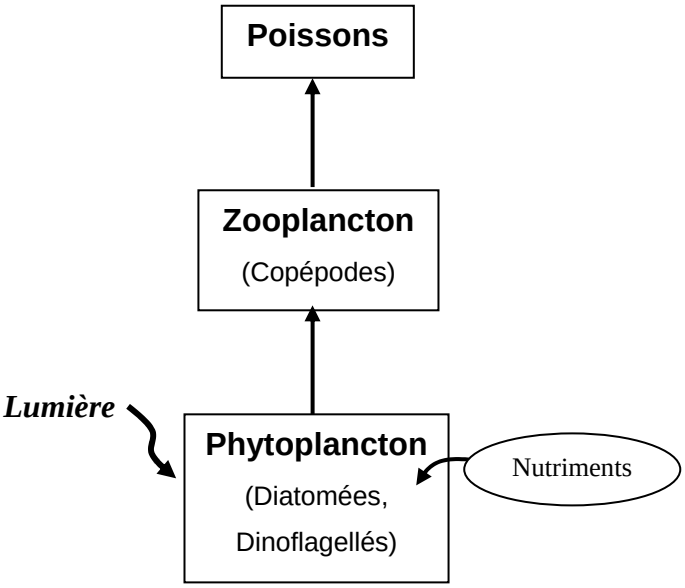


Figure I.1 – Chaîne alimentaire classique (Steele 1974)

Jusque dans les années 1970, la vision du réseau trophique planctonique était celle d'une chaîne alimentaire classique (Figure I.1), décrivant les flux de matière et d'énergie depuis les producteurs primaires vers les consommateurs terminaux (Steele 1974). Cette description était basée sur le seul composant microbien marin alors étudié : le phytoplancton. Les prélèvements se faisant par traits de filets, il était essentiellement composé de diatomées centriques et de dinoflagellés. Dans cette vision classique, la place du zooplancton était importante et le rôle des bactéries était limité à la dégradation de la matière organique détritique par libération des nutriments (minéralisation) qui y étaient intégrés (Cohen et al. 1982). Cette explication n'est toutefois pas suffisante pour comprendre l'ensemble des processus existant au sein du système planctonique.

I.1.1.2. La boucle microbienne

L'utilisation de la microscopie à épifluorescence pour dénombrer le bactérioplancton (Hobbie et al. 1977) et celle de traceurs pour l'étude des métabolismes (Azam & Hodson 1977, Fuhrman & Azam 1980) ont permis le développement de nouveaux concepts. Pomeroy (1974) apporte l'idée que les bactéries sont les premières consommatrices de la production phytoplanctonique marine et qu'elles produisent également de la matière organique particulaire. Cette action des bactéries permettrait de renvoyer vers les niveaux trophiques supérieurs jusqu'à

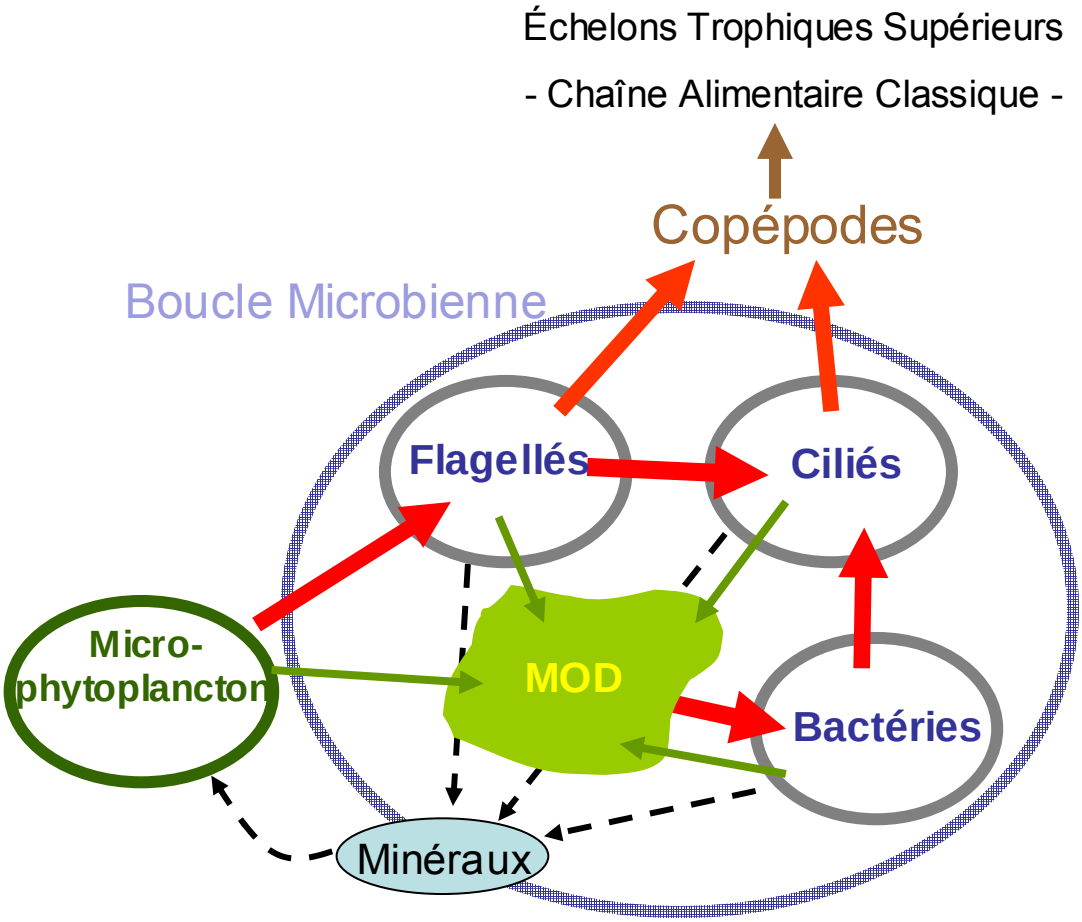


Figure I.2 – Concept de la boucle microbienne. Les flèches en rouge, signifiant « consommé par », représentent le transfert trophique de matière organique vers la chaîne alimentaire classique. A chaque étape de prédation des nutriments inorganiques (ammonium, phosphate) sont relargués par excrétion et utilisés par le phytoplancton (flèches en pointillé). Les pertes organiques sont représentées par les flèches vertes. Une partie du carbone est perdue par la respiration.

30% d'énergie en plus qu'estimé jusqu'alors (Sherr & Sherr 1988). Les bactéries sont intégrées à la chaîne alimentaire classique à travers le concept de boucle microbienne (Figure I.2). Dans ce nouveau modèle, une partie importante de la Matière Organique Particulaire (MOP) et de la Matière Organique Dissoute (MOD) est utilisée par les bactéries de la colonne d'eau pour leur croissance (Williams 1984). Les bactéries ne sédimentant pas, leur abondance est principalement contrôlée par le broutage des flagellés hétérotrophes (Fenchel 1982, Caron et al. 1985, Rassoulzadegan & Sheldon 1986) et des ciliés (Sherr & Sherr 1986). Ces processus permettent à une fraction de la matière organique détritique de retourner vers le réseau alimentaire classique. Le couplage bactéries-flagellés-ciliés constitue ce qui est appelé communément la « boucle microbienne ».

I.1.1.3. Le réseau trophique microbien

L'étude du phytoplancton a permis de mettre en évidence l'existence d'organismes de taille inférieure aux diatomées et aux dinoflagellés : le pico- et le nanophytoplancton. La biomasse de ce pico- et de ce nanophytoplancton autotrophe est maintenue en concentration constante dans l'océan par le broutage des protozoaires (Campbell & Carpenter 1986, Rassoulzadegan et al. 1988). Les liens directs entre les microorganismes hétérotrophes et le phytoplancton sont nombreux, ce qui amène à la notion de **réseau trophique microbien,** Figure I.3 (Sherr & Sherr 1988). Ce modèle suit le principe des relations trophiques basées sur la taille des organismes et selon lequel les prédateurs consomment des proies de taille environ 10 fois inférieure à leurs tailles respectives. Les ciliés sont l'une des sources principales de nourriture des métazoaires (Wiadnyana & Rassoulzadegan 1989) et constituent alors le lien entre les microorganismes et la chaîne alimentaire classique (Sherr et al. 1986). Outre leur place importante dans le cycle de la matière organique, les microorganismes ont un rôle essentiel dans le recyclage des éléments nutritifs. En effet, les bactéries sont réputées présenter des rapports C:N et C:P inférieurs à celui du phytoplancton et des protozoaires (Kirchman 1994 et références citées). Ces derniers recyclent ainsi les nutriments en excès lors de leur activité de broutage sur le bactérioplancton.

Le réseau trophique microbien : puits ou lien de la matière organique vers les niveaux trophiques supérieurs ?

Le réseau trophique microbien transforme la matière organique dissoute ou particulaire en biomasse bactérienne, transférée ensuite via les protozoaires aux niveaux trophiques supérieurs. Il constituerait donc un **lien** entre le compartiment détritique et le reste de la chaîne alimentaire.

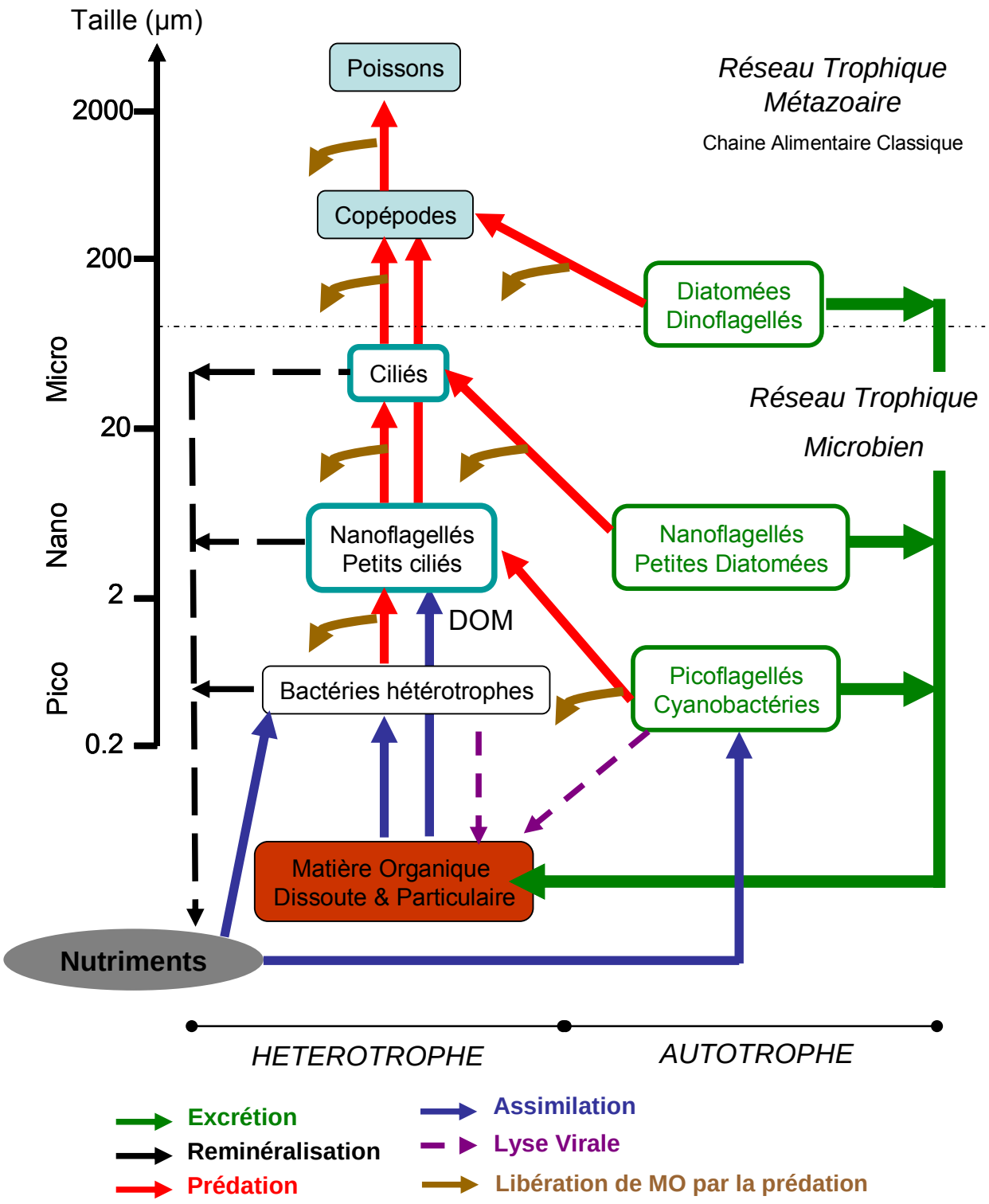


Figure I.3 – Schéma du réseau trophique microbien et de sa relation avec la chaîne alimentaire classique (modifié de Fenchel, 1988).

Toutefois, à chaque étape de broutage, une partie de la biomasse initiale est minéralisée sous forme de sels nutritifs et de CO_2 et n'est donc pas transférée aux niveaux trophiques supérieurs. En raison du nombre d'étapes de prédation, on peut s'attendre à ce que seule une infime partie du carbone consommé par les bactéries soit finalement transférée vers les échelons supérieurs. Le réseau trophique microbien constituerait alors un **puits**.

Des études réalisées en mésocosmes montrent que seuls 0,5 % à 2 % du carbone fixé par la production primaire sont transférés vers le zooplancton (Parsons et al. 1981, Gamble & Davies 1982, Ducklow et al. 1986, 1987). Le nombre élevé de niveaux trophiques entre les bactéries et les métazoaires ne permet donc pas, un transfert efficace dans la chaîne alimentaire et le réseau microbien constitue donc un puits. Au contraire, Sherr et al. (1987) ont mis en évidence le rôle de lien des microorganismes en montrant que les bactéries et/ou protozoaires pouvaient être directement ingérés par les métazoaires (Sherr & Sherr 1988, Wiadnyana & Rassoulzadegan 1989).

Ainsi, en raison de la réutilisation bactérienne de la MOD, de l'ingestion directe de la production primaire par les protozoaires (Caron et al. 1985), et du broutage direct des microorganismes par les métazoaires, le réseau trophique microbien jouerait plutôt un rôle de lien vers les échelons supérieurs.

Le réseau microbien n'est pas nécessairement prépondérant dans tous les milieux aquatiques. En fait, les deux grands types de réseaux trophiques décrits sont celui de type « herbivore », caractéristique des milieux riches en nutriments, et celui dominé par la « boucle microbienne » que l'on trouve dans les systèmes oligotrophes (Legendre & Rassouldzadegan 1995). Dans cette dernière situation, les bactéries hétérotrophes sont considérées comme des compétiteurs efficaces du phytoplancton pour les éléments nutritifs (Kirchman 1994). Selon Legendre & Rassouldzadegan (1995), il existe des intermédiaires entre ces deux réseaux extrêmes qui sont le réseau « multiprédateurs » et le réseau « microbien ». En effet, le réseau herbivore et la boucle microbienne sont des systèmes extrêmes instables tendant à se déplacer vers des réseaux plus stables. Il existerait donc un continuum trophique entre les deux extrêmes, dépendant des conditions du milieu. Ce continuum permet notamment au phytoplancton d'utiliser toute la gamme des concentrations en nutriments présents dans les eaux marines.

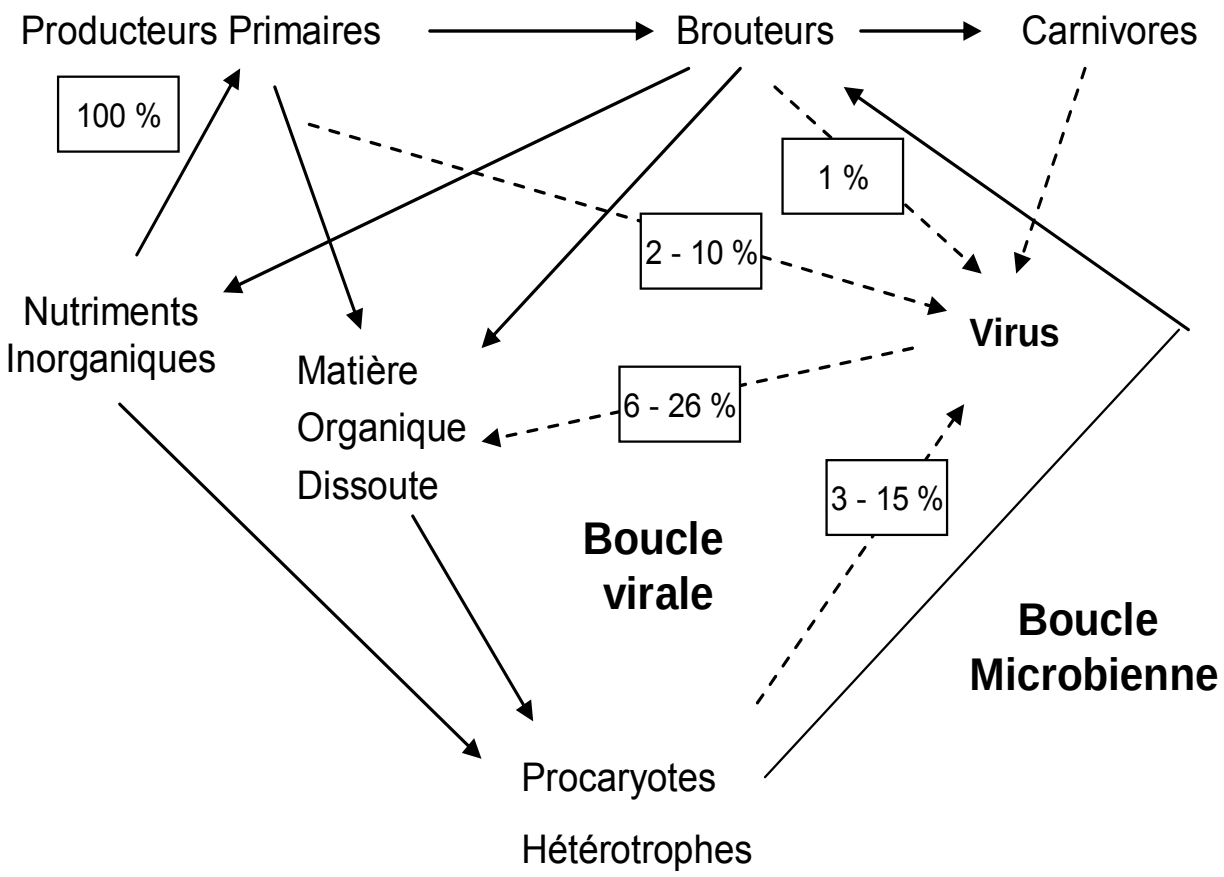


Figure I.4 – Modèle de chaîne alimentaire pélagique et des flux de carbone via les virus. Modèle de Fuhrman (1999) modifié par Weinbauer (2004). Valeurs de Wilhelm & Suttle (1999) du modèle stable sur l'influence des virus dans le cycle marin du carbone. Valeurs rapportées au carbone fixé par les producteurs primaires (100 %). Seules les données sur les virus sont montrées. De 6 à 26 % du carbone fixé par les producteurs primaires entre dans le pool de COD via la lyse virale à différents niveaux trophiques.

La boucle virale

Les bactéries planctoniques sont trop petites pour sédimenter et l'abondance bactérienne est relativement constante à long terme. Les protistes étaient auparavant considérés comme les seuls prédateurs importants des bactéries et donc les principaux responsables de cette constance des effectifs bactériens (McManus & Fuhrman 1988, Pace 1988). Fuhrman & Noble (1995) ont montré à partir de bilans de production et de mortalité bactérienne, une importance équivalente des virus et des protistes sur le contrôle de l'abondance bactérienne. Le rôle des virus dans le contrôle de la plupart des étages du réseau trophique pélagique a depuis été mis en évidence (Weinbauer 2004). Le réseau trophique microbien s'est donc à nouveau complexifié par l'intégration de la boucle virale, précisant le rôle de ces prédateurs dans le cycle des nutriments et du carbone (Figure I.4). En effet, la lyse virale induit la libération de matière organique dissoute qui devient alors de nouveau disponible aux bactéries. Outre leur contribution au contrôle de l'abondance bactérienne, les virus devraient avoir une influence sur la structure des communautés bactériennes en raison de la forte spécificité de leur prédation. Une hypothèse est celle du « *phage kill winner* » où les virus aident au contrôle des communautés bactériennes en régulant l'abondance des bactéries les plus compétitives pour la ressource nutritive. Les travaux en mésocosmes sur de courtes durées ne validant pas cette hypothèse, celle-ci s'appliquerait plutôt lors d'infections virales à long terme. Les études sur ce sujet n'en sont qu'à leur début et les mésocosmes restent encore trop simplifiés pour comprendre les effets à long terme des infections virales sur la composition et, donc la fonction des communautés bactériennes (Schwalbach et al. 2004, et références citées).

I.1.2. L'EUTROPHISATION

I.1.2.1. Définition générale

Le terme « eutrophisation » est souvent utilisé selon plusieurs significations, parfois même sans définition claire. On peut déjà s'accorder sur le terme eutrophe dont dérive le mot eutrophisation d'après la définition donnée par le dictionnaire technique de l'eau et des questions connexes (ed. Guy Le Prat, Paris, 1968) : une eau eutrophe est une eau riche en matières nutritives. L'eutrophisation d'un milieu serait donc *stricto sensu* le fait de devenir eutrophe, donc de s'enrichir en nutriments.

I.1.2.1.1. L'eutrophisation en milieu marin

L'enrichissement excessif des eaux est un problème qui se pose depuis longtemps dans les eaux douces et représente une menace croissante pour les lacs et autres plans d'eaux. L'eutrophisation se déclare en effet, préférentiellement dans des régions à circulation d'eau réduite. C'est pourquoi, l'eutrophisation des environnements côtiers est un phénomène reconnu depuis la dernière décennie seulement (Nixon 1995). La compréhension de ce phénomène complexe, qui « *désigne à la fois les causes et les conséquences de la fertilisation du milieu* » (Lacaze 1996) n'est donc qu'à ses débuts en milieu marin.

Le modèle de l'eutrophisation donnée par les limnologistes (Vollenweider 1976) traite la question par des fonctions signal-réponse. Le signal est une mesure de la disponibilité en phosphore (élément le plus souvent limitant en eaux douces) et la réponse une mesure des changements de la production ou de la biomasse phytoplanctonique. Les premiers modèles formalisant l'eutrophisation côtière étaient inspirés de cette approche de type Vollenweider (Figure I.5).

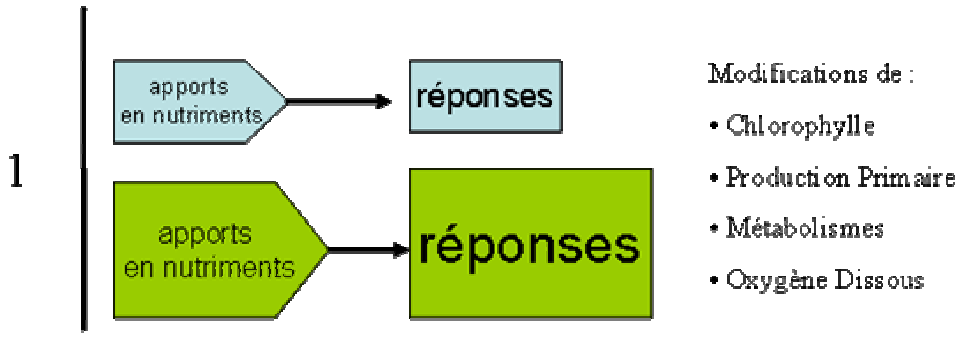


Figure I.5 - Premier modèle conceptuel de l'eutrophisation côtière. L'amplitude des réponses est proportionnelle aux apports en nutriments (Reproduit de Cloern, 2001).

Les premières études de l'eutrophisation côtière étaient ainsi menées suivant ce concept de la mesure du signal et de la réponse. Cependant, les systèmes marins et d'eaux douces ont des cycles de nutriments différents, entraînant des variations dans l'importance relative de l'azote et du phosphore comme élément limitant. De nombreuses études montrent que l'eutrophisation côtière ne correspond pas à un modèle conceptuel simple associant UNE réponse à UN signal donné. Nixon (1995) définit l'eutrophisation comme un accroissement de l'apport en matière organique. Alors que Cloern (2001) utilise ce mot dans un sens plus large se référant à la multitude des réponses biogéochimiques et écologiques (directes ou indirectes) à la fertilisation anthropique des écosystèmes à l'interface terre-mer (Figure I.6). Certains écosystèmes côtiers sont moins sensibles que d'autres au sur-enrichissement de nutriments, du fait de la présence de filtres et donc d'un « pouvoir tampon » du milieu récepteur. Breitburg et al. (1999) précisent que la qualité de l'eau et des ressources vivantes est le résultat de nombreux facteurs. Une étude de l'eutrophisation en milieu côtier doit donc considérer les interactions entre les enrichissements en nutriments anthropogéniques et d'autres facteurs tels que les pertes d'habitats, la pêche, les apports en contaminants toxiques, l'aquaculture, les apports en eaux douces ou le changement climatique. La sensibilité à des sur-enrichissements en nutriments n'est pas immuable et peut changer en réponse à des facteurs environnementaux (Howarth et al. 2000). Être capable d'identifier et de distinguer les impacts anthropiques des impacts climatiques sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes est critique pour comprendre et gérer les facteurs contrôlant la qualité des eaux, les conditions de l'habitat et les ressources biotiques (Paerl et al. 2003). Les autres facteurs de contrôle dans le processus d'eutrophisation sont la lumière, le renouvellement des eaux, la température et le contrôle biologique (zooplancton, boucle microbienne, benthos).

I.1.2.1.2. Nutriments et éléments limitants

Les nutriments, issus des activités humaines, les plus fréquemment à l'origine du phénomène d'eutrophisation sont l'azote et le phosphore (Smith et al. 1999, Lacaze 1996, Howarth et al. 2000, Anderson et al. 2002). Les activités humaines ont en effet profondément altéré les cycles de l'azote et du phosphore. La quantité de phosphore délivrée des terres vers les océans a plus que doublé du fait de ces activités (Howarth et al. 2000). La quantité d'azote disponible fabriquée, dans le milieu des années 1990, était de 140 Tg par an. Cet apport supplémentaire dans le cycle de l'azote est, comparativement, bien plus important que l'introduction de carbone dans le cycle du carbone par les émissions de CO_2 dans l'atmosphère (Howarth et al. 2000).

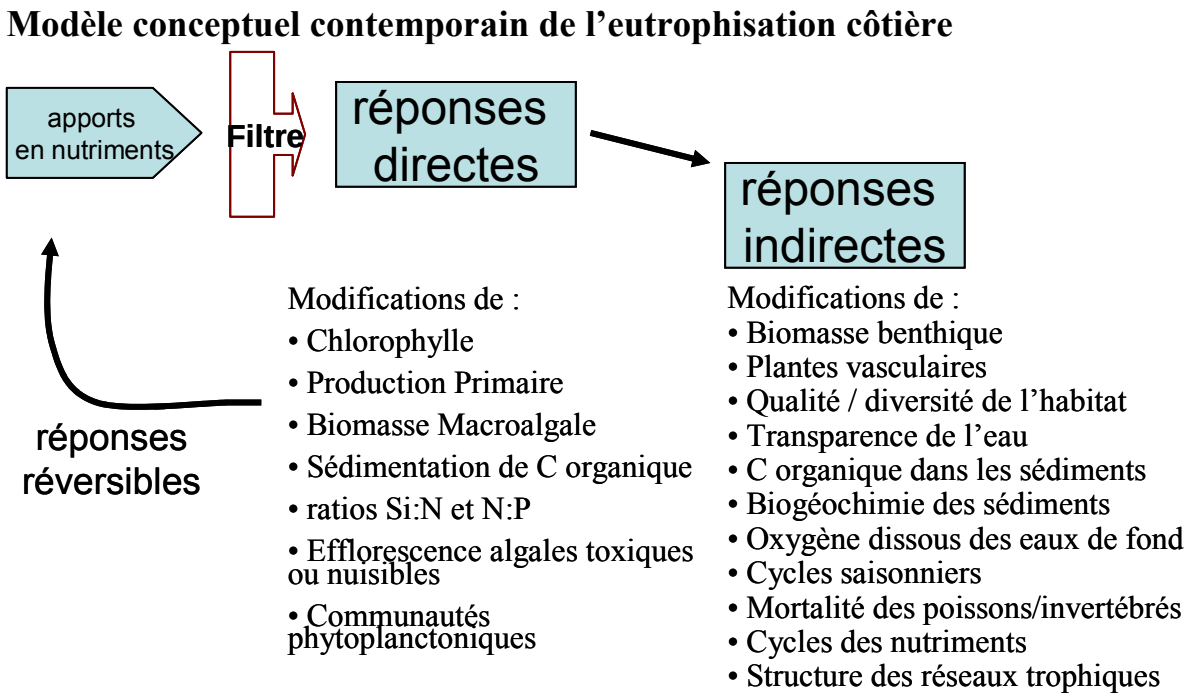


Figure I.6 - Modèle conceptuel contemporain de l'eutrophisation côtière. Les dernières avancées ont mis en évidence (1) une suite complexe de réponses directes et indirectes aux changements d'apports en nutriments ; (2) des attributs du système qui agissent comme un filtre pour modérer ces réponses et (3) la possibilité de réhabiliter le système par des actions de gestion appropriées pour réduire les apports en nutriments des écosystèmes côtiers sensibles (Reproduit de Cloern, 2001).

D'autres nutriments peuvent être mis en cause dans les processus d'eutrophisation :

- La silice (Si), qui est un élément important nécessaire à la croissance du phytoplancton. Les diatomées l'utilisent pour élaborer le frustule, sorte de coque siliceuse à deux valves s'emboîtant l'une dans l'autre. L'enrichissement du milieu en ce nutriment peut entraîner des efflorescences algales nuisibles ou toxiques (Officer & Ryther 1980). A l'inverse, un manque de silice peut exacerber le phénomène d'eutrophisation en réduisant le rôle des diatomées dans le réseau trophique côtier (Officer & Ryther 1980).
- Le fer (Fe), qui stimule la productivité du phytoplancton et entraîne des changements importants de la structure des communautés phytoplanctoniques lors d'expériences d'enrichissements en milieu non fermé, effectuées dans le Pacifique Equatoriale (eaux HNLC) (Coale et al. 1996, Cavender-Bares et al. 1999).

I.1.2.1.3. Limitation nutritive

La détermination du nutriment à l'origine de perturbations du milieu est un élément clef du contrôle de l'eutrophisation. Cette détermination fait appel à la notion de limitation nutritive. C'est le chimiste agricole allemand Justus von Liebig qui a mis en évidence la limitation du rendement de cultures agricoles par des quantités minimes de substances indispensables à la croissance des plantes. Liebig a de plus montré que le rendement maximum était limité par le nutriment indispensable le plus rare en fonction des besoins particuliers de la plante dans son environnement. Cette théorie est connue comme la Loi de Liebig du Minimum (Liebig 1840).

Le concept de limitation nutritive peut être considéré comme la clef de voûte de la recherche sur l'eutrophisation. En réalité, cela sous-entend :

1. qu'un nutriment clef doit être le premier facteur limitant la croissance d'une plante dans un écosystème donné,
2. que la croissance des plantes dans un écosystème donné doit être proportionnelle à l'apport en ce nutriment,
3. que le contrôle de l'eutrophisation doit être accompagné de la restriction des apports de ce nutriment clef à l'écosystème (Smith et al. 1999).

Identifier l'élément limitant

Redfield (1934) et Fleming (1940) ont analysé la matière organique particulaire d'échantillons d'eau de mer afin de déterminer le contenu cellulaire en carbone, azote et

phosphore du phytoplancton et du zooplancton. Le rapport moyen des atomes de ces trois éléments dans les échantillons de plancton était de 106C:16N:1P. La comparaison du rapport N:P des nutriments disponibles à la valeur standard 16N:1P permet ainsi de déterminer l'élément présent en quantité insuffisante. Pour la silice, la comparaison peut se faire au rapport N:Si de 1:1 déterminé pour les diatomées (Redfield et al. 1963, Brzezinski 1985). L'élément identifié sera probablement le facteur qui limitera la biomasse algale capable de se développer. Toutefois, les rapports ne doivent jamais être utilisés seuls pour identifier l'élément limitant d'un écosystème. En effet, si les éléments sont présents en quantité excessive, le rapport ne fournira pas d'information permettant l'identification des nutriments potentiellement limitants (Lacaze 1996). Il est alors nécessaire de faire appel à la dynamique d'assimilation des nutriments et de prendre en compte la concentration pouvant limiter son assimilation par le phytoplancton (Dortch & Whitledge 1992). Les valeurs seuils de la littérature en eaux marines côtières sont :

- N (NH_4 + NO_{3+2}) ≤ 1 µM, P ≤ 0,5 µM et Si ≤ 5 µM (Fisher et al. 1988)
- N (NH_4 + NO_{3+2}) ≤ 1 µM, P ≤ 0,1 µM et Si ≤ 2 µM (Justic et al 1995 et références citées)

En fait, Dortch & Whitledge (1992) apportent la nuance suivante : si l'on utilise la technique des concentrations et des ratios (limitation stœchiométrique), la détermination des éléments limitants ne peut être que potentielle. Si deux ratios indiquent qu'un nutriment donné est le premier élément limitant, mais que sa concentration est supérieure à la valeur seuil, alors la limitation potentielle est « suggérée ». Si la concentration est inférieure à la valeur seuil, alors la limitation par ce nutriment est « probable ».

Il faut souligner que les bactéries ont la capacité d'utiliser ou de relarguer des nutriments pour compenser le ratio des éléments de la matière organique utilisée pour la croissance bactérienne, qui diffère souvent de celui nécessaire à la biomasse bactérienne (Kirchman 2000). Fukuda et al. (1998) ont établi un ratio C:N de 6,8 ± 1,2 et 5,9 ± 1,1 pour des assemblages bactériens, respectivement côtiers et océaniques. Ce ratio ne serait donc pas si différent de celui généralement admis pour le phytoplancton. Le ratio C:P est généralement de 50 mais peut varier fortement (Vrede et al. 2002), ainsi le ratio N:P bactérien serait en général de 7,4 en milieu côtier et de 8,5 en milieu océanique.

Lorsqu'il est impossible de déterminer l'élément limitant sur la base des concentrations et des rapports des concentrations des nutriments prélevés dans la colonne d'eau, ou si l'on désire confirmer les résultats obtenus à partir de ces mesures, il est possible d'utiliser :

1. Les essais *in vitro*, dits « bioessais », qui consistent en l'ajout de concentrations connues de nutriments à des cultures d'algues standardisées ou à des populations naturelles dans des conditions optimales de lumière et de température.
2. Les corrélations entre les variables biologiques et les nutriments, déterminées *in situ*.

I.1.2.1.4. Apports de matière organique et de nutriments dans les écosystèmes côtiers

Les apports en matière organique dissoute et en nutriments dans le milieu peuvent être de type autochtone ou allochtone.

Les sources autochtones de matière organique dissoute, utilisées par les bactéries avec efficacité, sont la production phytoplanctonique dissoute (d'autant plus importante que le milieu est pauvre en nutriments, Nagata 2000, Moran & Estrada 2002, Moran et al 2002), le « *sloppy feeding* », l'excrétion et l'egestion zooplanctonique, la dissolution des pelotes fécales, la lyse virale et la remise en suspension des sédiments.

Les apports allochtones en matière organique ou inorganique sont liés au lessivage des sols, à la production primaire fluviale et aux activités anthropiques. Les différentes sources de nutriments dans les écosystèmes côtiers liées aux activités anthropiques sont (Howarth et al. 2000, Smith et al 1999 et références citées) :

- La **combustion de matières fossiles** qui constitue une source majeure d'apport en azote (Lacaze 1996).
- Les **eaux usées** qui sont la somme des apports domestiques et urbains. Les apports domestiques ou rejets ménagers contiennent des produits avides d'oxygène et d'éléments nutritifs. Les apports urbains sont constitués des eaux de lavage des rues, des trottoirs et des marchés, des eaux usées des commerces et artisanats, et enfin des eaux de pluies.
- L'**agriculture** dont une part petite mais significative de l'azote agricole total utilisé est en excès par rapport aux besoins des plantes pour leur croissance. L'excès d'azote peut (1) s'accumuler dans le sol, (2) se déplacer de la terre vers les eaux de surface, (3) migrer vers les eaux souterraines ou (4) entrer dans l'atmosphère via la volatilisation de l'ammoniaque et la production d'oxyde nitreux. Une large quantité de phosphore minéral est exploitée et transformée pour créer des engrais, dispersée à travers le monde sur des sols contenant déjà des réserves en phosphore. Une quantité non négligeable de phosphore s'accumule donc dans les sols et est exportée par lessivage (Lacaze 1996).

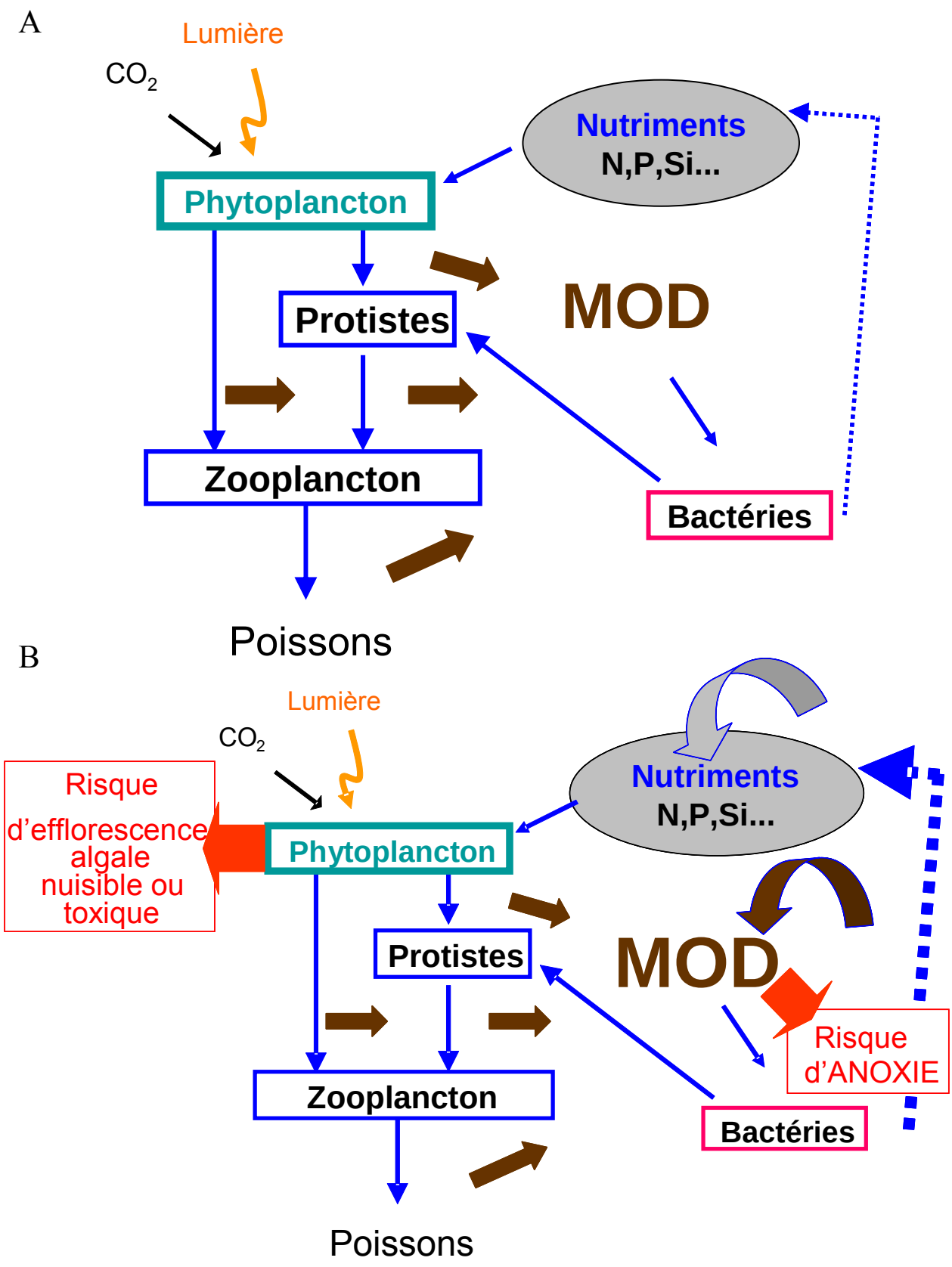


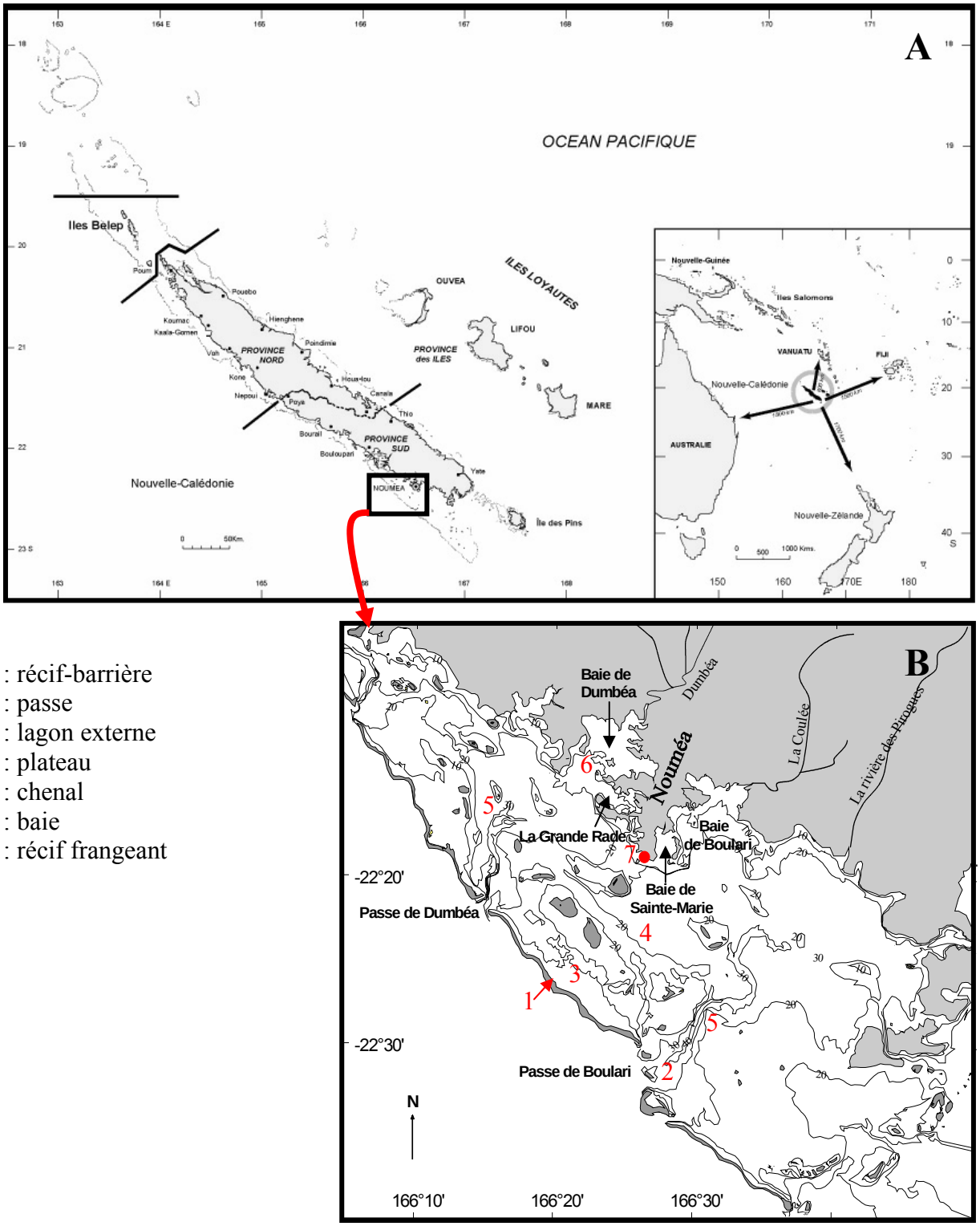
Figure I.7 – Réseau trophique planctonique simplifié en conditions stables (A), avec des apports nutritifs en excès (B). Les flèches bleues représentent la prédation, les flèches en pointillé la reminéralisation, les flèches brunes les relargages de MOD liés à la prédation.

I.1.2.2. Eutrophisation et réseau trophique microbien

Les effets majeurs de l'eutrophisation en milieu marin côtier reportés dans la littérature sont généralement (Smith et al.1999) :

- L'accroissement de la biomasse phytoplanctonique et des algues épiphytiques.
- Des changements de la composition en espèce phytoplanctonique vers des taxons qui peuvent être toxiques ou nuisibles.
- L'accroissement des blooms nuisibles de zooplancton gélatineux.
- Des changements dans la production, la biomasse et la composition spécifique des macroalgues.
- Des changements dans la production, la biomasse et la composition spécifique des plantes vasculaires.
- La réduction de la transparence de l'eau.
- La mort et la disparition des coraux constructeurs de récifs.
- L'élévation du pH et la diminution de l'oxygène dissous dans la colonne d'eau.
- Des changements de composition vers les espèces animales les moins désirables.

La plupart de ces conséquences ne sont observables que lorsque l'écosystème est déjà très perturbé. L'étude des microorganismes, en tant qu'indicateurs des modifications des apports en nutriments, permet d'avoir une expression rapide des changements survenant dans l'environnement. En effet, les bactéries et les microalgues ont un taux de croissance potentiellement rapide et sont très liées aux cycles des éléments nutritifs. Ce sont donc des indicateurs directs et sensibles de l'état de l'écosystème et des variations qui surviennent au sein de celui-ci (Paerl et al. 2002, 2003). Des changements au sein des populations microbiennes émergent souvent bien avant que des perturbations n'apparaissent dans les échelons trophiques supérieurs et permettent donc d'intervenir avant que les conséquences se transmettent à l'ensemble de l'écosystème. L'activité conjuguée des bactéries et de leurs consommateurs, dans un système soumis à des apports extérieurs en matière organique et en nutriments minéraux, peut conduire à un surcroît de production de biomasse bactérienne et à une libération des éléments nutritifs contenus dans la matière organique allochtone qui, en s'ajoutant aux apports directs, augmenteront l'eutrophisation (Figure I.7). Ce phénomène est potentiellement plus important en milieu oligotrophe où le système est dominé par la boucle microbienne et où les ressources nutritives sont susceptibles de limiter la production planctonique.



1 : récif-barrière
2 : passe
3 : lagon externe
4 : plateau
5 : chenal
6 : baie
7 : récif frangeant

Figure I.8 – Carte de la Nouvelle-Calédonie et de sa position dans le Pacifique sud-ouest (A) Carte du lagon sud-ouest (B)

I.2. CADRE DE L'ETUDE

L'étude des conséquences de sur-enrichissements en nutriments sur le réseau trophique planctonique d'un milieu, nécessite tout d'abord de connaître les différentes sources possibles en nutriments dans la colonne d'eau. Ainsi, après une brève description géographique de notre site d'étude, nous nous intéresserons aux différentes sources de nutriments dans la colonne d'eau :

- les apports liés au système benthique,
- les apports terrigènes,
- les apports anthropiques.

I.2.1. DESCRIPTION GEOGRAPHIQUE

I.2.1.1. La Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie (Figure I.8A) se situe au nord du tropique du Capricorne dans l'Océan Pacifique Sud entre les latitudes 19-23°S et longitudes 163-168°E. L'archipel est constitué de la Grande Terre (île principale), de trois groupes d'îles (les Loyauté, l'Ile des Pins, les Belep) et de quelques îles inhabitées. La Grande Terre est bordée par une couronne de constructions récifales immergées dont la superficie (environ 8000 km^2) est approximativement la moitié de celle de l'île. La distance à la côte de ce récif-barrière varie de quelques kilomètres à 65 kilomètres environ. Ce récif délimite un lagon de 23400 km^2 dont la profondeur ne dépasse guère 40 m (Dandonneau et al. 1981, Labrosse et al. 2000).

I.2.1.2. Le lagon sud-ouest

Le littoral du lagon sud-ouest (Figure I.8B) de la Nouvelle-Calédonie est découpé avec de larges baies et de nombreuses presqu'îles. On distingue du large vers la côte, un récif barrière entrecoupé par des passes, un lagon externe, un plateau, un chenal, des baies puis un récif frangeant. Le lagon externe, qui correspond à la zone d'arrière récif n'est profond que de 5 à 10 m. Le plateau constitue la plus grande aire du lagon et sa profondeur moyenne est de 20 m. le plateau est entrecoupé par des chenaux pouvant dépasser 40 m, qui se dirigent vers le récif barrière par un canyon sous-marin, puis une passe. Les passes coupent le récif-barrière avec des profondeurs de 30 à 70 m (passe de Boulari) et 80 m (passe de Dumbéa). Le lagon interne est constitué de baies peu profondes. Le récif frangeant borde par endroits le rivage du lagon sud-ouest.

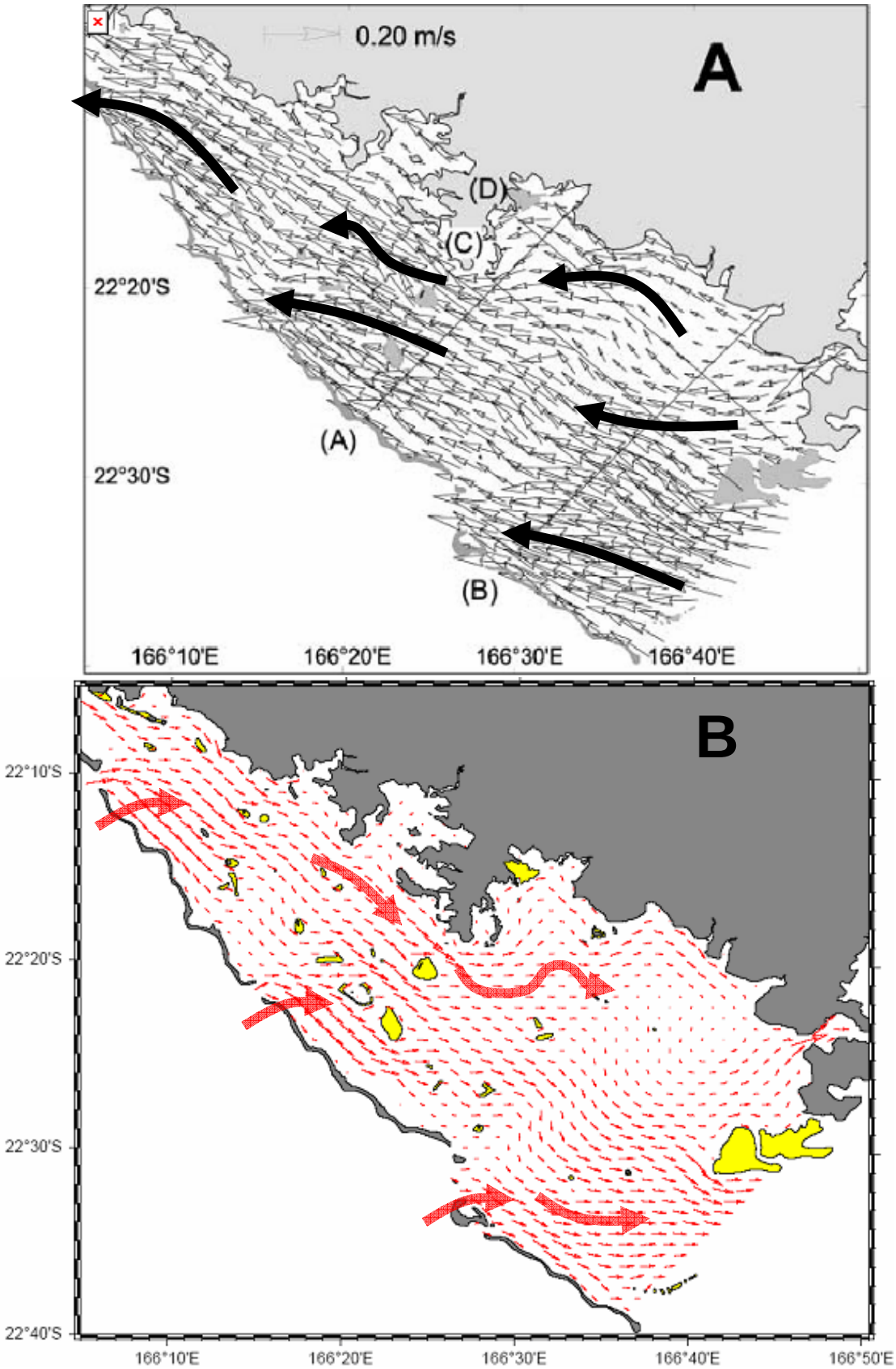


Figure I.9 – (A) Courants de surface simulés induits par un vent de Sud-Est (110°) de 8 m.s^{-1} (Douillet et al. 2001) et (B) courants de surface simulés induits par un vent d'ouest (270°) de 8 m.s^{-1}

I.2.1.3. Hydrodynamisme local

La connaissance de l'hydrodynamisme d'un milieu d'étude est essentielle à l'évaluation des conséquences du phénomène d'eutrophisation. En effet, elle peut en accentuer ou atténuer les effets suivant ses caractéristiques (courantologie, temps de résidence).

Courantologie

La courantologie dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie est maintenant bien connue depuis la validation d'un modèle 2D (Douillet 1998) puis 3D (Douillet et al. 2001). Les facteurs contrôlant la circulation des eaux du lagon sont la marée et surtout le vent. La direction du courant de surface est contrainte par les limites du lagon et contrôlée par la direction du vent (Douillet et al. 2001).

Dans cette région du Pacifique Ouest, le vent est dominé par des flux d'alizés venant principalement de l'Est et du Sud Est. Les vents d'une orientation comprise entre 80 et 140° représentent presque 70 % des directions de vent observées en moyenne journalière sur l'année (moyennes effectuées sur des données entre 1990 et 1996, Bujan 2000). Ces alizés (110°) sont présents tout au long de l'année, et ponctuellement entrecoupés de coups de vent d'ouest (270°), plus particulièrement en hiver. Lorsque le vent souffle au Sud-Est (vitesse moyenne 8 $m.s^{-1}$, direction 110°), il pousse l'eau lagonaire de surface vers le Nord-Ouest (Figure I.9A) et les eaux océaniques oligotrophes du bassin de la Nouvelle-Calédonie entrent dans le lagon par le Sud puis s'évacuent par les passes.

Le second régime de vent le plus fréquent, orienté à l'Ouest, est caractéristique de la saison hivernale ou des dépressions tropicales et des cyclones. La courantologie de surface induite par ces vents entraîne les eaux océaniques dans le lagon par les passes pour ensuite s'échapper par le lagon sud. Ce régime de vent confine les eaux côtières dans les baies et limite leur renouvellement, contrairement aux vents de Sud-Est (Figure 1.9B).

Temps de résidence des eaux

L'océan constitue une source de renouvellement du lagon en eau oligotrophe. Bujan (2000) a tout d'abord estimé pour l'ensemble du lagon sud-ouest, et pour toutes les conditions de vent simulées, que le temps de résidence moyen des eaux est de 10,9 jours. Il met en évidence que pour un alizé de 8 $m.s^{-1}$, les temps de résidence sont inférieurs à 4 jours, avec des valeurs maximales dans les baies (3 à 4 jours pour la baie de Dumbéa, 2 à 3 jours pour la baie de

Boulari), et des valeurs minimales (quelques heures) dans le chenal lagonaire (plateau). Lors d'un vent d'ouest de 8 $m.s^{-1}$, où les apports extérieurs en eau oligotrophe proviennent de la mer de corail par les passes, les temps de résidence moyens sont légèrement plus faibles (excepté dans la baie de Dumbéa et donc la Grande Rade où ils sont plus élevés et > 4 jours) qu'en condition d'alizé.

I.2.2. APPORTS PAR LE SYSTEME BENTHIQUE

I.2.2.1. Les récifs barrières ou frangeants

Le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie est limité par un récif-barrière et des récifs frangeants bordent certaines zones du littoral. Le système récifal peut avoir une influence sur la structure et la biomasse d'un système planctonique, soit par le biais d'apports en nutriments supplémentaires soit par la prédation sélective des assemblages coralliens sur les organismes planctoniques (Van Duyl et al. 2002 et références citées). L'importance potentielle des récifs comme facteur de contrôle du réseau trophique planctonique est abordée dans le paragraphe suivant.

Trois types de fonds sédimentaires (Chardy et al. 1988) ont été définis dans le lagon sud-ouest, en fonction des données sédimentologiques (Chevillon 1985, Debenay 1985) et des caractéristiques biocénotiques du benthos :

- Les **fonds envasés**, situés près des côtes et dans les anciens lits de rivières maintenant immergés
- Les **fonds de sable gris** qui couvrent la zone intermédiaire et sont constitués d'un sédiment hétérogène
- les **fonds de sable blancs**, situés dans la zone d'arrière récif-barrière.

La répartition spatiale de ces fonds est respectivement de 30, 50 et 15 % sur l'ensemble du lagon sud-ouest (Chardy et al. 1988, Figure I.10) et les constructions coralliennes ne représentent donc que 5 % de la zone d'étude. La plupart des études sur les sédiments lagonaires tropicaux se rapportant aux zones récifales, barrières ou frangeantes, mettent en évidence des matériaux venant en majorité des constructions coralliennes et d'algues calcaires. Au contraire, les sédiments du lagon sud-ouest sont essentiellement d'origine biogène (foraminifères, articles d'Halimeda ou débris de mollusques) et même dans les fonds blancs d'arrière récif, la contribution des débris coralliens est minoritaire (Chevillon 1996).

La faible influence des structures coralliennes sur la composition des sédiments, leur faible pourcentage par rapport aux autres horizons sédimentaires permet de poser l'hypothèse d'une influence négligeable des structures coralliennes sur le réseau trophique planctonique dans la majeure partie du lagon étudié.

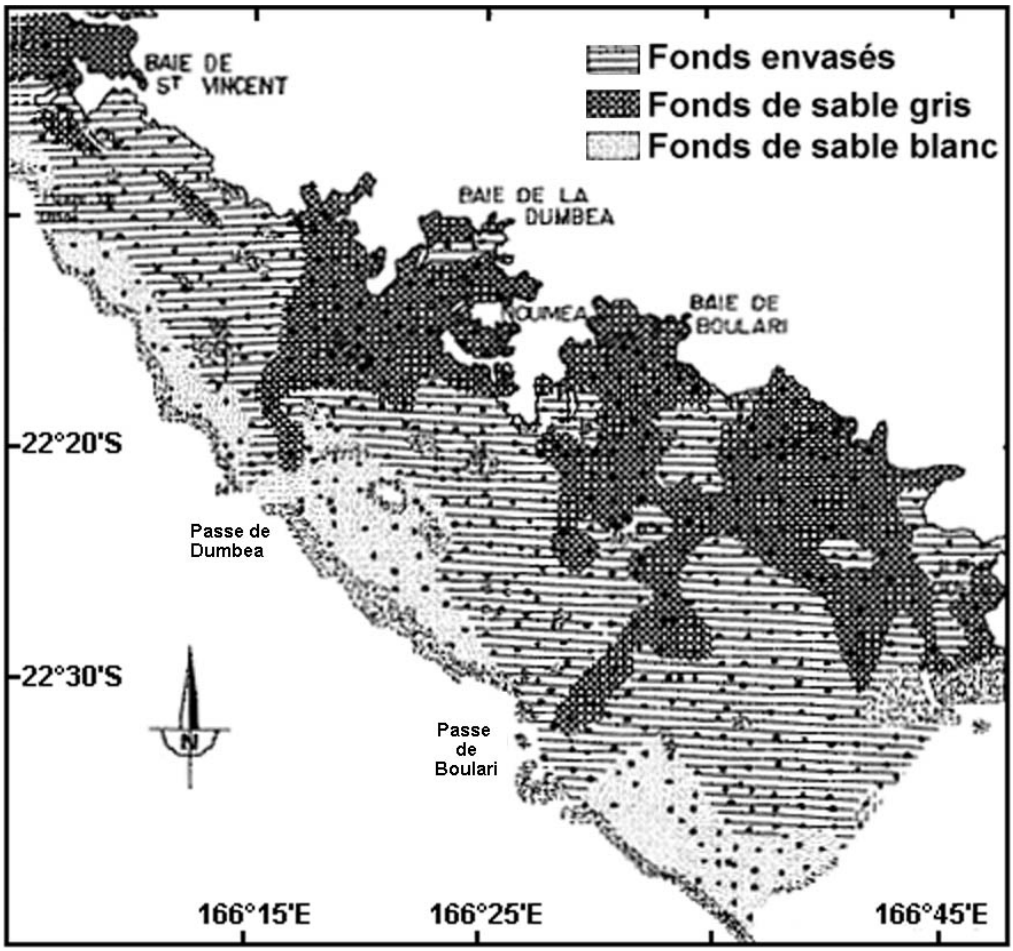


Figure I.10 –Caractérisation sédimentologique du lagon sud-ouest (Chardy et al. 1988)

I.2.2.2. Interface benthos-pelagos

Les fonds non coralliens du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie ont fait l'objet de nombreuses études, tant au niveau de la composition des communautés benthiques (Chardy et al. 1987, 1988, Garrigue 1995, 1998, Garrigue & DiMatteo 1991, Garrigue et al. 1992) que de l'évaluation des flux à l'interface eau-sédiment (Boucher & Clavier 1990, Boucher et al. 1994a, 1994b, Clavier et al. 1994, 1995, Clavier & Garrigue 1999, Grenz et al. 2003).

En terme de biomasse, le fonds du lagon sont dominés par des algues charnues, calcaires et des phanérogames (62,5 %, 24,3 % et 13,2 %, respectivement). Les fonds très envasés près des côtes ou très profonds et les fonds blancs d'arrière récif-barrière ne supportent pas de macrophytes. Sur les fonds gris, la part principale de la biomasse est constituée par des algues

calcifiées. Ces espèces vont surtout entrer dans le réseau trophique sous forme de détritus. Mais ces produits de dégradation se composent essentiellement de molécules complexes réfractaires difficilement dégradées par les micro-organismes (Garrigue 1995). Ce transfert de matière vers la colonne d'eau reste donc assez minime.

A partir de l'étude des flux de sédimentation, Clavier et al. (1995) mettent en évidence une faible contribution de la production primaire pélagique dans l'alimentation du compartiment benthique. Ces auteurs montrent que la principale source de carbone organique sédimentée est d'origine allochtone et provient du récif ou de la zone côtière, ce qui suggère un relatif découplage du benthos et du pelagos dans le lagon.

De même l'étude des flux métaboliques (respiration et production primaire brute) à l'interface eau–sédiment met en évidence à partir du rapport moyen de la production brute à la respiration que les sédiments du lagon sud-ouest sont en moyenne hétérotrophes (Clavier & Garrigue 1999). La production primaire benthique, maximale à proximité du récif, devient minimale dans les fonds blancs envasés. Il est possible de distinguer deux types de fond selon ces bilans. Le premier est constitué de sédiments significativement hétérotrophes avec de faibles flux métaboliques et correspond aux dépôts vaseux près des côtes et aux parties les plus profondes du lagon. Ces sédiments sont soumis à des courants de faible vélocité (Douillet 1998) et sont les principaux sites où se dépose le carbone organique particulaire (Clavier et al. 1995). Le deuxième type de fond, autotrophe, est composé des sables gris et blancs. Ces fonds, sous influence de forts courants de marée (Douillet 1998), sont composés de communautés benthiques avec de fortes biomasses de phanérogames et les produits de la production primaire benthique sont utilisés directement par les métabolismes locaux (Clavier & Garrigue 1999). Ces auteurs estiment que les deux tiers des fonds du lagon sont hétérotrophes, ce qui implique des apports extérieurs par les écosystèmes adjacents pour les alimenter.

Les apports en nutriments dans le système pélagique provenant du système benthique sont donc considérés dans la plupart des cas comme négligeables. Cependant, la remise en suspension de sédiments par un forçage physique (vent) dans les zones de faible profondeur peut parfois permettre un enrichissement du milieu en éléments nutritifs.

I.2.3. APPORTS TERRIGENES

I.2.3.1. Hydrologie des cours d'eau

Les principales rivières débouchant dans le lagon sud-ouest sont du Sud vers le Nord : la rivière de Prony en baie de Prony, la rivière des Pirogues et la Coulée en baie de Boulari, la Dumbéa en baie de Dumbéa, la Tontouta, la Ouengi et la Ouaméni en baie de Saint-Vincent (Figure I.11). Elles déversent dans le lagon des eaux douces chargées en particules. Le relief accidenté, l'imperméabilité locale des sols et l'importance des intensités pluviométriques occasionnent un fort ruissellement qui donne naissance à une multitude de « creeks » au régime violent et irrégulier. Ces torrents impétueux charrient lors des crues (au moment des cyclones Baltzer & Trescases 1971, mais aussi au cours de l'année Baltzer 1969) des débits solides, abondants, allant de la boue aux galets de plusieurs dizaines de centimètres (Moniod & Mlatac 1968). En effet, la Nouvelle-Calédonie reçoit en moyenne 1700 mm de pluie par an (Moniod & Mlatac 1968). L'altération des roches des bassins versant est donc très importante (Trescases 1975) et les eaux de rivière charrient alors une grande quantité de matière solide vers le lagon.

Figure I.11 – Réseau hydrographique partie Sud de la Grande Terre. Les aires colorées représentent les bassins versants des rivières qui nous intéresseront plus particulièrement dans cette étude (V. Chevillotte, non publiée).

I.2.3.2. Caractéristiques des apports terrigènes

Fréquence

La fréquence et l'importance des apports terrigènes sont étroitement liées aux conditions pluviométriques et donc climatiques.

La Nouvelle-Calédonie est située dans la zone intertropicale, juste au nord du tropique du Capricorne. La variation annuelle de la position de la ceinture anticyclonique subtropicale (ZCIT, Zone de Convergence InterTropicale) et celle des basses pressions intertropicales déterminent deux saisons principales séparées par deux intersaisons.

- La première saison principale, dite « saison chaude et humide », de novembre à avril, est liée à la position de la ZCIT au niveau du 15ème parallèle sud, entraînant un air chaud et humide et une élévation de la température des eaux jusqu'à 26-27°C. La forte température des eaux océaniques est alors responsable de la création de dépressions tropicales et de cyclones à cette période, avec une moyenne annuelle de 1,5 cyclones par an.
- La seconde saison, dite « saison fraîche », de juin à août, résulte du déplacement vers le Nord de l'équateur de la ZCIT permettant aux dépressions polaires de se rapprocher de la Nouvelle-Calédonie. Pendant cette période la température des eaux peut atteindre 21-22 °C et le territoire est soumis à des pluies pouvant être fortes.

Deux saisons de transitions permettent le passage de la saison humide à la saison fraîche :

- d'avril à mai, marquant la fin progressive des fortes précipitations et de la chaleur estivale,
- de septembre à novembre, la saison la plus sèche, accompagnée d'une augmentation de la température et d'un retour des alizés.

A ces variations saisonnières s'ajoute l'influence du phénomène climatique El Niño (ENSO, El Niño Southern Oscillation). Durant les périodes El Niño, la ZCIT se déplace le long de l'équateur et les masses d'eaux associées comme les eaux chaudes du Pacifique Ouest-Central sont déplacées vers l'Est (Delcroix & Lenormand 1997). Le principal effet de l'ENSO dans cette zone est une période sèche de plus longue durée et une diminution significative de la fréquence des cyclones.

De par ces caractéristiques climatiques, les pluies sur les bassins versants sont très variables tant au niveau mensuel qu'annuel. La variabilité interannuelle des précipitations est en effet très importante, pouvant varier du simple au quintuple. L'irrégularité mensuelle est encore plus grande avec une période des pluies d'octobre à février, où les précipitations les plus fortes

sont liées aux cyclones ou aux dépressions tropicales. A cette irrégularité des chutes de pluie est liée celle des débits des rivières. La pente importante des bassins versants et la faible perméabilité des sols ne font qu'accuser ces écarts au lieu de les amortir.

Composition des apports terrigènes

La Nouvelle-Calédonie, contrairement à la plupart des îles du Pacifique, n'est pas d'origine volcanique. Près du tiers de sa surface totale est couverte de roches ultrabasiques[1]. Constitués de telles roches, les sols des bassins versants des rivières du lagon sud-ouest sont pratiquement dépourvus d'aluminium et composés essentiellement de silicium et de magnésium, éléments tous deux solubles dans les conditions de surface. La roche mère contient, en teneurs anormalement élevées, des éléments que l'on range habituellement dans le cortège des éléments traces comme le nickel, le chrome, et le cobalt. Le lessivage des roches ultrabasiques et la production de latérites enrichies en métaux (en particulier en fer, manganèse, cobalt, chrome et nickel) facilitent donc le transport de ces métaux vers le lagon (Ambatsian et al. 1997).

Peu de données existent sur la composition en matière organique et inorganique des rivières. Seul Trescases (1975) a mesuré les concentrations en minéraux sur la rivière Dumbéa. Les concentrations moyennes de silicates dans les eaux de la rivière, calculées sur quatre années d'observation pour la Dumbéa Est, et trois années pour la Dumbéa Nord, sont de 233 $\mu M.l^{-1}$ de SiO_2 pour la Dumbéa Est avec un débit moyen de 3,42 $m^3.s^{-1}$ et de 240 $\mu M.l^{-1}$ de SiO_2 pour la Dumbéa Nord avec un débit moyen de 1,58 $m^3.s^{-1}$. Rougerie (1985) mesure dans le lagon des concentrations en silice variant de 1,8 µM au niveau des passes à des teneurs supérieurs à 20 µM dans les baies. Sur le lagon sud-ouest, les concentrations moyennes en silicate mesurées par Rougerie (1985) sont de 4,3 µM.

Ces apports terrigènes permettent donc d'avoir une source d'approvisionnement en silice dissoute non négligeable, qui ne devrait donc pas constituer un élément limitant la production autotrophe.

[1] Roche magmatique contenant moins de 45% en poids de SiO_2.

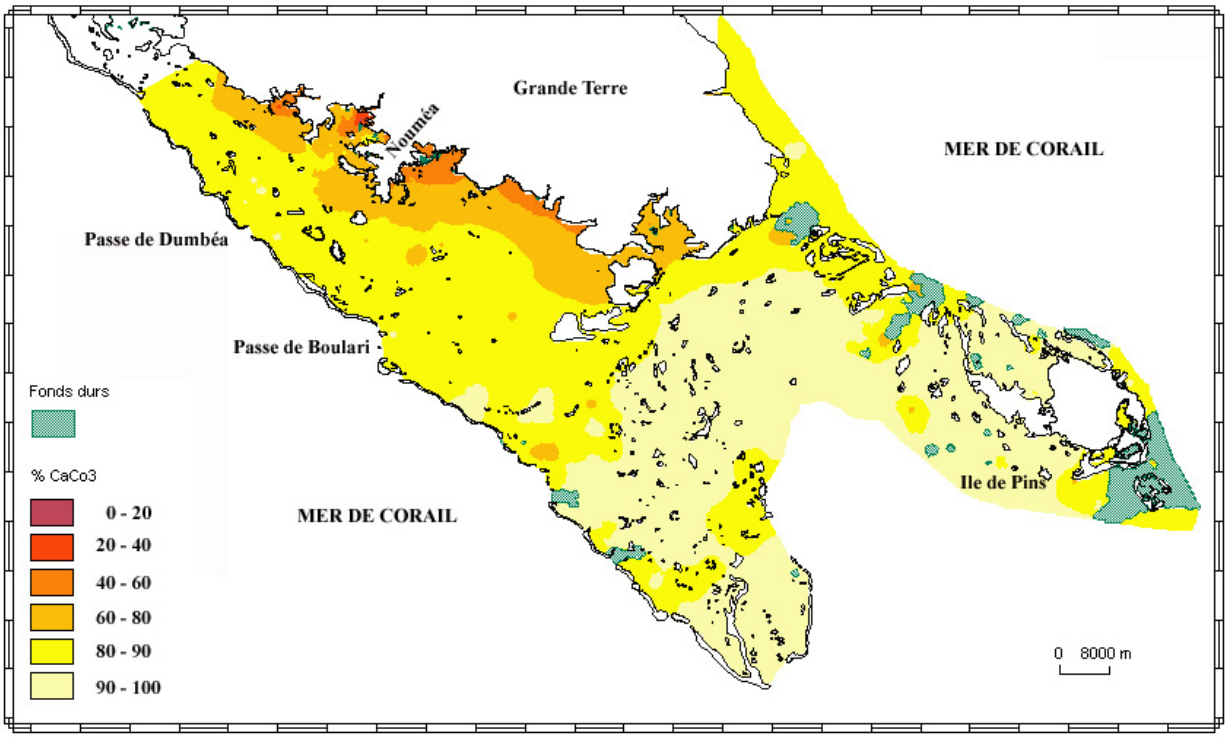


Figure I.12 – Carte de la composition des sédiments en carbonates (C. Chevillon, non publié).

Zone d'influence des apports terrigènes dans le lagon

L'étude de la teneur en carbonate des sédiments permet d'évaluer l'impact des apports terrigènes sur le lagon. Les concentrations indiquent une influence terrigène prédominante près de la côte et décroissant vers le récif-barrière. Ainsi, l'influence des apports terrigènes sur la sédimentologie du lagon sud-ouest reste faible, malgré des apports non négligeables (Figure I.12). Il est donc probable que la circulation hydrodynamique permette une dilution rapide des apports terrigènes en limitant fortement leur sédimentation.

I.2.4. APPORTS ANTHROPIQUES

L'industrie minière est la principale ressource économique de la Nouvelle-Calédonie. Les minerais exploités depuis 1875 sont le chrome, le fer, le cobalt, le manganèse, l'or, le cuivre, le plomb, l'argent et le charbon, mais le nickel est de loin la principale ressource minérale du pays (Labrosse et al. 2000). Les conséquences de l'exploitation minière sur le lagon, dont les apports en métaux dans le milieu s'ajoutent aux apports naturels, sont de deux sortes :

1. Une sédimentation accrue liée à l'apport supplémentaire de particules du fait de la déforestation et donc de l'érosion plus importante des sols. Cette sédimentation a des conséquences sur les récifs frangeants, autant sur les organismes benthiques que pélagiques en entraînant une augmentation des dépôts de particules et une diminution de la pénétration lumineuse.
2. Une contamination probable des organismes marins par les métaux (Breau 2003, Warnau et al. sous presse)

Outre les apports en éléments nutritifs sous forme organique ou inorganique liés aux rivières et à la présence de mangroves dans les fonds de baie, la ville de Nouméa contribue de manière significative aux apports en nutriments dans le lagon. La population de Nouvelle-Calédonie est estimée à 220500 habitants (ISEE, 2004). La ville de Nouméa concentre 60 % de cette population et 75 % des industries. La densité y atteint 1425 hab.km^{-2} contre 4 hab.km^{-2} hors de la ville. Les apports urbains, véhiculés par les principaux émissaires d'effluents domestiques sont pour la plupart rejetés dans le lagon sans traitement, notamment en baie de Sainte-Marie et dans la Grande Rade.

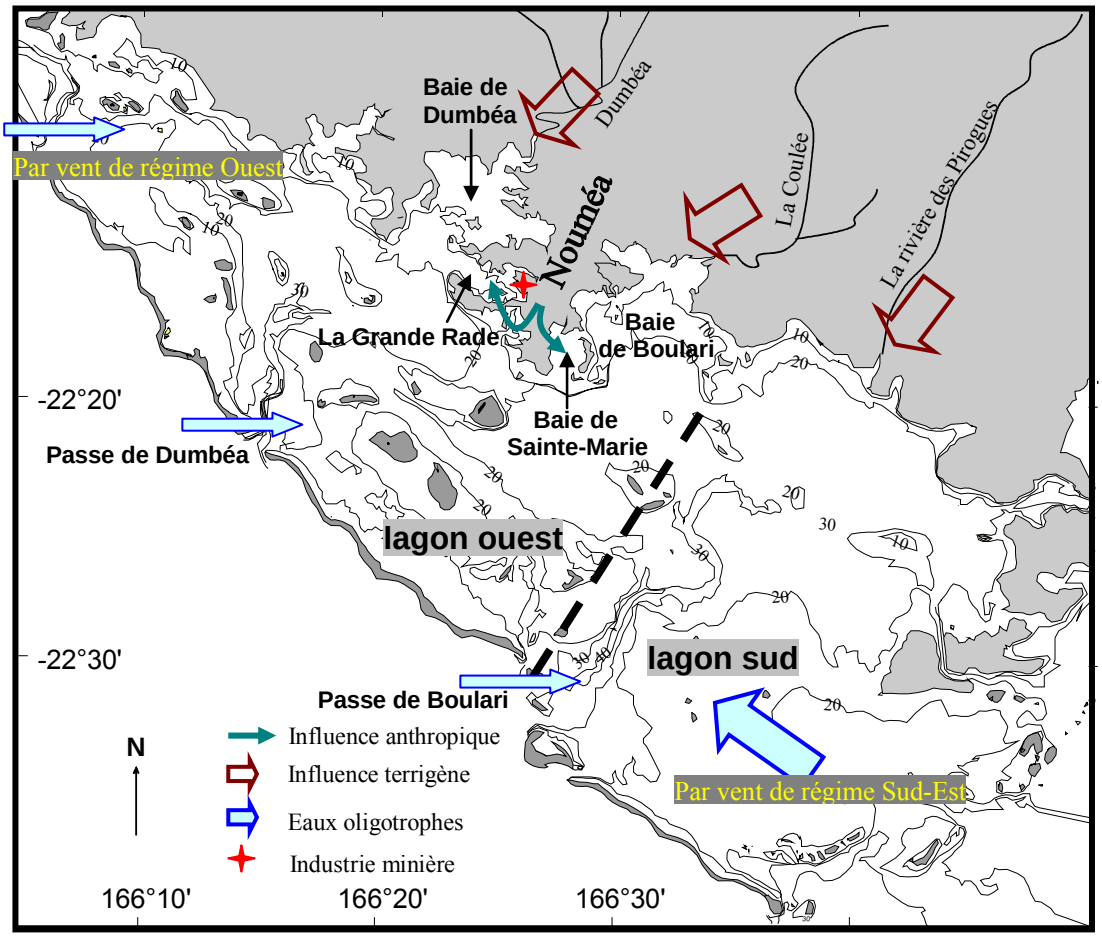


Figure I.13 – Le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Des zones sous différentes influences. La ligne en tirets figure la distinction entre lagon ouest et lagon sud.

I.2.5. UN LAGON SOUS DIFFERENTES INFLUENCES

Les principales sources d'éléments nutritifs du réseau trophique planctonique dans le lagon sud-ouest sont donc les apports terrigènes et ceux liés aux activités anthropiques. Les apports terrigènes sont importants, mais irréguliers, et présentent une zone d'influence peu étendue sur le lagon. Les apports anthropiques sont réguliers et en continuelle augmentation. Les courants permettent un renouvellement périodique des eaux lagonaires par l'apport d'eaux océaniques.

Ces différentes caractéristiques font du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie un site d'étude particulièrement adapté pour la compréhension de l'impact des apports anthropiques et terrigènes sur le réseau trophique microbien en milieu oligotrophe. On distinguera au cours de cette étude différentes zones géographiques en fonction des influences dominantes auxquelles elles sont soumises (Figure I.13) :

- La **baie de Boulari** est essentiellement soumise aux apports terrigènes véhiculés par la rivière La Coulée et de manière plus indirecte par la rivière des Pirogues. Ces deux rivières drainent des bassins versants présentant des activités d'extraction minières passées et présentes importantes.
- La **baie de Dumbéa** est soumise pour une large part aux apports terrigènes de la rivière Dumbéa, et pour partie aux apports industriels de l'usine de traitement de minerai de nickel (Grande Rade).
- La **Grande Rade** est caractérisée par la présence de l'usine pyrométallurgique gérée par la "Société Le Nickel " en fond de baie et reçoit en outre des eaux usées.
- La **baie de Sainte-Marie** est sous influence anthropique en recevant les eaux usées non traitées du quartier de Sainte-Marie.

Les autres zones lagonaires, plus éloignées des influences anthropiques et terrigènes sont *a priori* les zones les plus oligotrophes. Dans certains cas, une partie lagon sud et une partie lagon ouest seront distinguées. La partie sud est en effet la plus oligotrophe, car directement sous l'influence des apports dominants en eaux océaniques.

I.3. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les changements induits par l'activité humaine dans le cycle des nutriments n'ont pas lieu de manière uniforme à travers le monde. Les perturbations les plus importantes se concentrent dans les zones où la densité de population humaine et la production agricole sont les plus fortes. La plupart des bilans effectués sur le thème de l'eutrophisation ne traitent que des états de l'hémisphère nord et plus précisément européens (Cognetti 2001) ou des Etats Unis (Howarth et al. 2000) où les eaux côtières sont naturellement riches dans la plupart des cas (exception faite de la Méditerranée). Ces études ne sont généralement pas applicables aux conditions des eaux tropicales coralliennes qui sont souvent de type oligotrophe. Les eaux du lagon sud-ouest sont sous l'influence des eaux océaniques environnantes et des apports terrigènes (limités aux stations proches de la côte) lui conférant un caractère oligotrophe à mésotrophe. Autour de Nouméa les apports urbains conduisent à des concentrations localement plus élevées en éléments nutritifs, on s'attend donc à ce que le système passe d'un réseau microbien à un réseau de type herbivore (Legendre & Rassoulzadegan 1995) du lagon vers les zones urbaines. La structure des premiers échelons du réseau trophique planctonique pourrait alors constituer un indicateur sensible de l'état du milieu.

Le plancton du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie n'a fait l'objet que de très peu d'études. Si le compartiment bactérien n'a jamais été étudié, les compartiments phytoplanctonique et zooplanctonique n'ont fait l'objet que de quelques rares travaux. Ces études réalisées sur le plancton nous apportent les informations suivantes. La concentration en chlorophylle *a* moyenne mesurée dans le lagon sud-ouest entre 1976 et 1979 est de 0,57 $\mu g.l^{-1}$, pour des valeurs comprises entre 0,26 et 1,01 $\mu g.l^{-1}$. Les concentrations sont généralement inférieures à 0,3 $\mu g.l^{-1}$ vers la partie sud du lagon ou dans les eaux superficielles océaniques (Rougerie 1985). Des prélèvements effectués en 1973 dans les eaux océaniques proches indiquent une dominance du phytoplancton en coccolithophoridés, les espèces dominantes étant *Coccolithus huxleyi* et *Gephyrocapsa oceanica* (Desrosières 1975). A l'opposé, des dénombrements effectués entre 1977 et 1979 de manière mensuelle dans différentes zones du lagon montrent une prédominance en Chaetoceros (Diatomées) dans les baies où la concentration en éléments nutritifs est plus importante. Les communautés du chenal lagonaire, où les conditions physico-chimiques sont stables, sont homogènes et composées de tous les taxons (Cardinal 1983).

Ces travaux pionniers montrent donc des situations trophiques suffisamment contrastées pour avoir une influence sur la structure des communautés phytoplanctoniques, avec une dominance de coccolithophoridés en milieu pauvre, et une dominance de diatomées en milieu enrichi par les apports continentaux. Les dénombrements de copépodes remontent aussi à la fin des années 1970. Leur répartition spatiale n'est pas homogène et des différences de peuplements sont observables en fonction des caractéristiques des apports terrigènes (Binet 1984, 1985). *Acartia australis* domine la population de copépodes aux abords du récif. *A. amboinensis* est le plus abondant dans les zones les plus profondes des baies, alors que *Canthocalanus pauper, Paracalanus parvus, Bestiola sp., Centropages orsinii, A. bispinosa* sont caractéristiques des fonds de baie.

Ces premières observations mettent en évidence des changements spécifiques de certains compartiments planctoniques en relation probable avec les conditions nutritives du milieu. **L'objectif général de ce travail est donc d'établir quelles sont les réponses des compartiments phytoplanctoniques et bactériens aux modifications des conditions environnementales en fonction des concentrations en éléments nutritifs.** Les réponses sont étudiées en terme de stock (biomasse) et de flux (production de biomasse, demande bactérienne en carbone) et également en terme de structure des peuplements. Pour atteindre cet objectif général, les producteurs primaires et les bactéries ont été étudiés selon les stratégies d'échantillonnage et les méthodes d'analyses présentées dans le Chapitre II.

La sensibilité d'un milieu au sur-enrichissement en éléments nutritifs est fonction d'autres facteurs pouvant interagir dans le processus d'eutrophisation. Parmi ces facteurs, les conditions climatiques induisent des variations naturelles des paramètres descripteurs des espèces phytoplanctoniques et bactériennes. Le lagon est soumis à des fluctuations saisonnières des variables physiques et météorologiques telles que la température, la salinité, le vent ou l'irradiance (Bujan 2000, Douillet et al. 2001, Pinazo et al. 2004, Ouillon et al. soumis). La biomasse phytoplanctonique lagonaire, attestée par la concentration en Chl.*a*, montre aussi l'existence d'une saisonnalité faible, mais mesurable, à laquelle se juxtaposent des variations à court terme (semaine, Binet & Leborgne 1996) et des différences interannuelles prononcées (Clavier et al. 1995, Binet & Leborgne 1996). Ces fluctuations temporelles en Chl.*a* sont également observables dans l'océan proche (Dandonneau & Gohin 1984, Dupouy non publié). Dans ce contexte, les premiers objectifs de cette étude sont (1) de caractériser les variations des

abondances et activités phytoplanctoniques et bactériennes, et des nutriments à différentes échelles de temps allant de l'heure à la saison, et (2) de comprendre dans quelle mesure les paramètres environnementaux physiques influencent ces variables biologiques. Les biomasses et activités planctoniques montrent une variabilité à court terme très importante en regard des amplitudes saisonnières (Jacquet 2001), c'est pourquoi le suivi annuel réalisé d'avril 2002 à avril 2004 a été réalisé à une fréquence d'acquisition élevée, hebdomadaire à bi-mensuelle (Chapitre III).

Une fois établie la représentativité temporelle des différentes variables biologiques, l'objectif suivant est d'établir la réponse des premiers échelons du réseau trophique planctonique aux variations locales en éléments nutritifs (Chapitre IV). La détermination du premier élément limitant la production planctonique est essentielle dans l'étude de l'eutrophisation. Pour cela, deux approches sont *a priori* possibles à partir des données *in situ*. Les concentrations en nutriments et leurs rapports respectifs sont le plus souvent comparés aux rapports de Redfield pour évaluer l'élément le plus susceptible d'être limitant (cf. I.1.2.1.3.). Une autre méthode consiste à déterminer les corrélations entre biomasses, productions et taux de croissance phytoplanctonique et bactérienne, d'une part, et les concentrations en nutriments, d'autre part, dans une gamme de situations la plus étendue possible. Cette étude spatiale fournit une opportunité de comparer ces deux approches.

En milieu océanique, le bactérioplancton hétérotrophe est alimenté en carbone organique par la production primaire. Dans cette situation, le bactérioplancton est considéré comme un compétiteur efficace du phytoplancton pour les nutriments minéraux (Kirchman 2000) et il pourrait donc limiter la production primaire en mobilisant les nutriments lorsqu'il n'est pas limité en carbone (Drakare 2002). A l'opposé, dans les écosystèmes soumis à des apports extérieurs comme les baies les plus anthropisées du lagon de Nouvelle-Calédonie, les bactéries hétérotrophes, en utilisant la matière organique allochtone pour produire un surcroît de biomasse bactérienne et en libérant une partie des nutriments de cette matière organique (notamment au cours de leur prédation par les protistes), devraient tendre à aggraver le phénomène d'eutrophisation. Aux situations les plus altérées, une part de la demande en carbone bactérien devrait donc être assurée par les apports allochtones et non par la seule production primaire planctonique[2] et la demande en carbone bactérien devrait donc excéder la production primaire.

[2] La production primaire benthique est insignifiante aux stations les plus riches (Pringault, pers. comm.).

Cette étude à l'échelle spatiale a donc également pour objectif d'évaluer les relations entre la production bactérienne et la production primaire, en répondant aux questions suivantes : (1) La production bactérienne est-elle liée à la production primaire sur la gamme de situations trophiques rencontrées ? (2) Que représentent la production bactérienne et la demande bactérienne en carbone par rapport à la production primaire ? (3) La demande bactérienne en carbone augmente-t-elle plus rapidement que la production primaire en remontant les gradients d'enrichissement ? (4) Excède-t-elle la production primaire aux sites les plus altérés par les activités humaines ?

Enfin, les mesures globales des stocks et des flux au sein des compartiments planctoniques ne caractérisent qu'incomplètement les changements induits par les apports anthropiques et leurs conséquences potentielles. La taille et la composition spécifique de ces communautés sont en effet susceptibles de conditionner largement les transferts de carbone (Fuhrman 1992) et de contaminants métalliques (Wang 2002) vers les niveaux supérieurs des réseaux trophiques. Quelques rares études montrent par ailleurs des interactions entre dynamique des contaminants métalliques et des nutriments (Riedel & Sanders 2003). Des changements de composition des communautés phytoplanctoniques sont généralement observés lors de l'eutrophisation d'un milieu (Smith et al. 1999). Une seconde approche, plus qualitative, s'est donc intéressée à la structure des peuplements phytoplanctoniques en fonction de l'eutrophisation (Chapitre V). Les questions qui sont traitées sont **:** (1) La taille du phytoplancton change-t-elle avec la disponibilité en nutriments ? (2) Peut-on observer des variations cohérentes de la composition des assemblages de picophytoplancton et de microphytoplancton en fonction des concentrations en nutriments ?

Enfin, la structure des communautés bactériennes peut également changer en fonction des ressources nutritives (Pinhassi & Berman 2003). Il est encore difficile de lier la structure des assemblages microbiens à leurs potentialités cataboliques, et donc d'anticiper les conséquences potentielles d'éventuels changements communautaires en réponse à l'eutrophisation. Une première évaluation de la structure de ces communautés en liaison avec les conditions environnementales a donc nécessairement une vocation essentiellement descriptive. Ainsi le dernier objectif de ce travail est d'évaluer la structure des communautés bactériennes en milieu lagonaire non perturbé, et son évolution en fonction des conditions d'eutrophisation (Chapitre VI). Pour cela ce travail tentera de répondre aux questions suivantes : (1) Peut-on distinguer, et donc doit-on traiter indépendamment, la structure des communautés bactériennes libres et

attachées aux particules ? (2) La structure des communautés de bactérioplancton montre-t-elle des variations temporelles importantes dans une zone du lagon Sud-Ouest éloignée des impacts humains ? (3) Peut-on mettre en évidence des variations spatiales des communautés bactériennes associées aux enrichissements induits par les apports terrigènes et anthropiques ?

Mon travail de thèse a été effectué dans le cadre des recherches sur la caractérisation et la modélisation des échanges dans un lagon soumis à des influences terrigènes et anthropiques menées par l'UR 103 de l'IRD. Cette étude s'intègre plus particulièrement dans l'axe de recherche « réponses des biocénoses planctoniques » et s'intègre dans le chantier PNEC de Nouvelle-Calédonie. Outre le support financier de l'IRD et du PNEC, ce travail a été soutenu par le programme ZoNéCo (opération : « Indicateurs de l'Etat de l'Environnement ») et un financement du Ministère de l'Outre-Mer (« Biodiversité planctonique dans le lagon de Nouvelle-Calédonie »).

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

La description des différents compartiments du réseau trophique microbien étudié dans ce travail de thèse a nécessité l'utilisation de techniques variées. Ainsi, nous avons allié la description physico-chimique du milieu à des techniques propres à l'étude du compartiment microbien, comme la mesure des activités bactérienne et phytoplanctonique par incorporation de radiotraceurs, la description des communautés phytoplanctoniques par microscopie et celle des communautés bactériennes par approche moléculaire. Ces techniques ont pour la plupart été réalisées au centre IRD de Nouméa, d'autres ont nécessité la collaboration de laboratoires extérieurs. Les détails de ces approches sont développés et illustrés dans ce chapitre.

II.1. STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

II.1.1. ECHANTILLONNAGE SPATIAL

II.1.1.1. Choix des sites d'échantillonnage

Les stations sont réparties sur le lagon selon des gradients côte – large pour couvrir des situations trophiques les plus étendues possible. Cinq radiales composées de 6 stations sont réparties dans 4 baies proches de Nouméa et dans le chenal lagonaire (Figure II.1)

Les baies échantillonnées sont :

- **La baie de Sainte-Marie** : Cette baie d'une superficie de 4 km^2 est bordée de récifs frangeants et la partie centrale est couverte d'un champ corallien mêlé à des macroalgues. Les trois principaux bassins versants urbanisés qui débouchent sur la baie de Sainte-Marie couvrent une superficie totale de 225 ha pour un nombre total de 23 000 habitants, soit une densité de 10 000 $hab.km^{-2}$. Ainsi, environ 6000 m^3 d'eaux usées non traitées sont délivrés chaque jour à travers 49 exutoires dans cette baie qui se trouve ainsi soumise à un net gradient d'eutrophisation. Depuis quelques années on observe un fort envasement du récif frangeant situé au fond de la baie et sa colonisation par un peuplement extrêmement dense d'algues vertes (*Ulva* principalement). Les apports anthropiques véhiculés par les principaux émissaires d'effluents domestiques et directement rejetés sur le platier récifal sont vraisemblablement à l'origine de l'eutrophisation de la frange littorale.

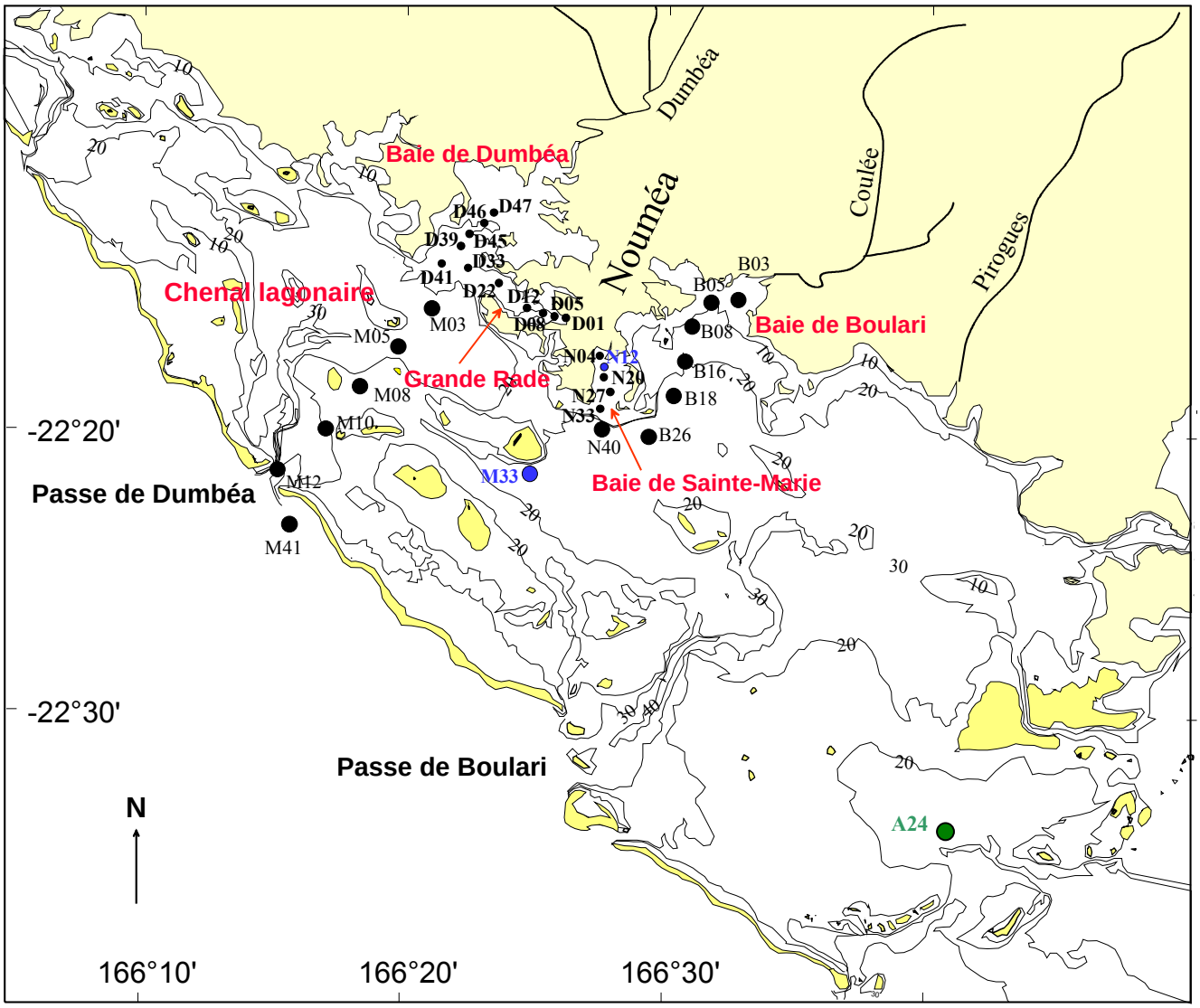


Figure II.1 – Stations échantillonnées dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie. Les stations M33 (Chenal lagonaire) et N12 (Baie de Sainte-Marie) ont fait l'objet d'un suivi annuel d'Avril 2002 à Avril 2004 et de suivis journaliers en Avril 2002 et Juin 2003. La station A24 a été échantillonnée en septembre 2000 pendant un cycle de 24 heures.

- **La Grande Rade** : Située à l'ouest de la péninsule de Nouméa, elle débouche dans la baie de Dumbéa. Cette baie est sous influence urbaine et industrielle notamment par la présence de la Société Le Nickel, qui utilise l'eau de mer comme liquide de refroidissement. De petites industries de traitement des métaux et des matières plastiques présentes autour de la baie émettent également des produits polluants dans le milieu dont ni la quantité ni la qualité ne sont surveillées.

La baie de Sainte-Marie et la Grande Rade sont considérées comme les baies potentiellement les plus anthropisées.

- **La baie de Dumbéa et la baie de Boulari** : Ces baies sont sous influence quasi exclusivement terrigène, par les rivières Dumbéa et la Coulée.
- En outre, **une radiale lagonaire** allant de la sortie de la baie de Dumbéa à la passe de Dumbéa est échantillonnée afin de se soustraire de toute influence anthropique ou terrigène.

II.1.1.2. Fréquence d'échantillonnage

Chaque sortie en mer permet d'échantillonner une radiale complète, toujours à la même heure (entre 6 et 8 heures). Une série de 5 radiales a été échantillonnée à trois périodes différentes de l'année (Tableau II.1). La représentativité à la journée des mesures de production bactérienne, de biomasse phytoplanctonique et des éléments nutritifs a été testée au cours de cycles journaliers (cf. § II.1.2.2.).

Tableau II.1 - Périodes d'échantillonnage des radiales

Radiale	Période 1	Période 2	Période 3
Sainte-Marie	23 avril 2002	20 août 2002	7 janvier 2003
Grande-Rade	18 avril 2002	23 août 2002	10 janvier 2003
Dumbéa	15 mai 2002	22 août 2002	9 janvier 2003
Boulari	25 avril 2002	21 août 2002	8 janvier 2003
Chenal lagonaire	24 mai 2002	19 août 2002	15 janvier 2003

II.1.1.3. Profondeur de prélèvement

L'échantillonnage simultané de 6 stations par radiale n'autorise pas le prélèvement sur l'ensemble de la colonne d'eau. L'eau est prélevée à 3 m de profondeur pour éviter la couche de dessalure éventuelle après les précipitations. La représentativité de la mesure à 3 m sur la colonne d'eau a été évaluée en utilisant les mesures de fluorescence *in situ,* indicatrices de la biomasse phytoplanctonique, acquis par une sonde CTD lors de prélèvements effectués en Mars-

Avril 2001. Un test de comparaison de moyenne (test-*t* modifié) a été appliqué sur les moyennes de la tranche 2-4 m et sur celle de l'ensemble de la colonne sur les 79 profils où les moyennes de 2 à 4 m sont disponibles. Les résultats du test montrent que la tranche 2-4 m ne donne pas une moyenne différente de la colonne d'eau complète (au seuil 0,01) dans 25 cas. Elle est supérieure dans 16 cas et inférieure dans 38 cas. Ces écarts sont toutefois assez modérés en moyenne. En effet, la moyenne dans la colonne 2-4 m représente 0,83 fois la moyenne dans la colonne d'eau sur les profils sous estimés et 1,17 fois la moyenne dans la colonne d'eau sur les profils surestimés. Ainsi, les tests réalisés sur les moyennes de la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a* dans la tranche 2-4 m et dans la colonne d'eau complète, montrent que les prélèvements effectués à 3 m sont représentatifs de la colonne d'eau à ± 20 %.

II.1.2. ECHANTILLONNAGE TEMPOREL

II.1.2.1. Choix des sites d'échantillonnage

Deux stations ont été choisies pour faire l'objet d'un suivi à plus haute fréquence sur une année. La station M33 a été choisie d'une part pour sa représentativité du chenal lagonaire, et d'autre part parce qu'elle faisait partie d'un suivi temporel réalisé de 1979 à 1983 (Binet & Le Borgne 1996). Une deuxième station, N12 située dans la baie de Sainte-Marie a été choisie comme exemple de site sous forte influence anthropique. Ces 2 stations présentent l'avantage de pouvoir être échantillonnées au cours d'une même sortie en mer de moins de 2 h. Les prélèvements pouvaient ainsi être traités au laboratoire moins de 1h30 après le premier prélèvement.

II.1.2.2. Fréquence d'échantillonnage

Suivi saisonnier

Au cours du programme ECOTROPE, un suivi temporel a été effectué selon une fréquence mensuelle. Cette fréquence n'est toutefois pas suffisante pour mettre en évidence la saisonnalité modeste du lagon sud-ouest (SW) de Nouvelle-Calédonie. En effet, seule la moyenne normalisée d'environ 30 stations réparties sur le lagon SW fait apparaître des variations saisonnières. Pour le suivi saisonnier réalisé sur les deux stations M33 et N12, le choix s'est donc porté sur une fréquence de prélèvement hebdomadaire pendant les périodes des maxima attendus de biomasse phytoplanctonique en Avril-Mai et Décembre-Janvier selon Binet & Le Borgne 1996 (Figure II.2) et bimensuelle le reste de l'année.

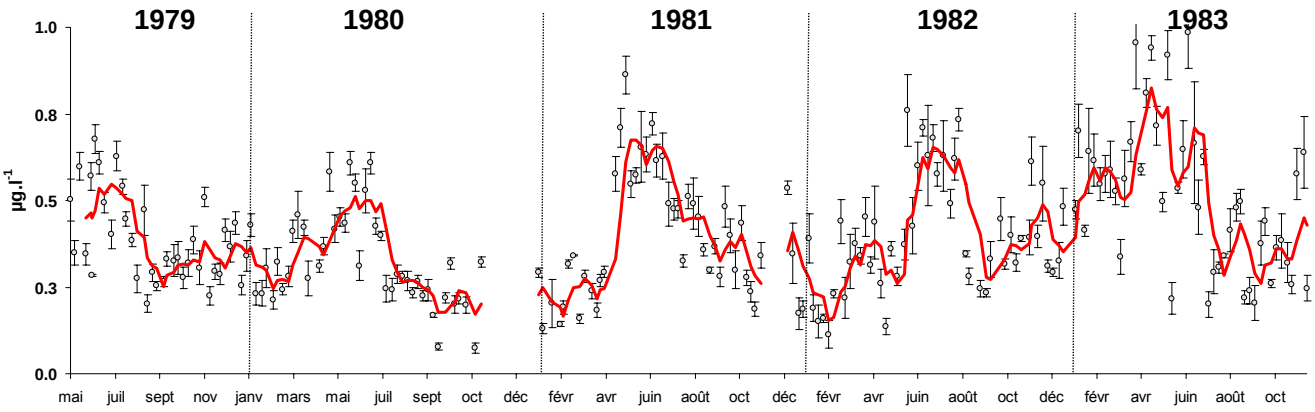


Figure II.2 – Suivi hebdomadaire de la chlorophylle *a* de 1979 à 1983. Les points représentent la moyenne des 3 stations proches de Nouméa et les barres représentent l'erreur standard. La courbe figure la moyenne mobile de période 4 (données de Binet & Le Borgne 1996).

Cycle journalier

Afin de connaître la variabilité intrinsèque des mesures sur 24h (c'est à dire hors des forçages physiques) et de vérifier la représentativité des mesures ramenées à la journée, des cycles journaliers ont été réalisés en Septembre 2000 (cycle de 24h en station A24), en Avril 2002 (cycle de 48 heures en stations M33 et N12) et en Juin 2003 (cycle de 24 heures en station M33). Les stations A24 et M33 ont été choisies car, situées dans des zones lagonaires homogènes et loin des apports des rivières, les mouvements des masses d'eau liés à la marée ou au vent sont peu susceptibles d'influer sur les mesures. La station N12 a été choisie afin d'être sous influence anthropique. Les prélèvements ont été généralement effectués 3 m sous la surface et parfois 3 m au dessus du fond.

II.1.2.3. Profondeurs de prélèvement

Au cours de l'étude saisonnière, les deux stations échantillonnées ont été prélevées à 5 profondeurs différentes réparties de manière homogène sur la colonne d'eau afin de limiter les biais dus à une éventuelle structuration verticale. Les profondeurs de prélèvement sont 3 ; 7,25 ; 11,5 ; 15,75 et 20 m en M33 (Z = 24 m), et 3 ; 4,75 ; 6,5 ; 8,25 et 10 m en N12 (Z = 12 m). Les cinq prélèvements étaient rassemblés en un seul dès l'arrivée au laboratoire avant de procéder aux analyses.

II.2. COMPARTIMENT PHYTOPLANCTONIQUE

II.2.1. CHLOROPHYLLE a

Dès l'arrivée au laboratoire, 300 à 500 ml des prélèvements étaient filtrés en duplicata sur des membranes Whatman GF/F (porosité nominale 0,7 µm, fraction totale), Nuclepore de porosité 2 µm (fraction >2 µm) et Nuclepore de porosité 10 µm (fraction >10 µm). Les échantillons étaient immédiatement placés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse.

Les concentrations en Chlorophylle *a* et Phéophytine *a* ont été déterminées par fluorimétrie au moyen d'un fluorimètre TURNER TD 700 selon la méthode de Yentsch & Menzel (1963). Les concentrations des pigments sont données par les formules de Lorenzen (1966), modifiées par Jeffrey & Humphrey (1975) :

$$[Chla](\mu g.l^{-1}) = (F_0 \cdot F_a) \times \frac{v}{1000 \times V \times (K \cdot K_a)} \times D \qquad [Phéoa](\mu g.l^{-1}) = v \times \frac{K \times F_a - K_a \times F_0}{1000 \times V \times K_a \times (K - K_a)} \times D$$

Avec :

v : volume de l'extrait (7 ml)
K_a : facteur d'étalonnage du fluorimètre pour la Phéophytine *a* pure (Chl.*a* pure acidifiée)
V : volume filtré (l)
K : facteur d'étalonnage du fluorimètre pour la Chl.*a* pure
D : facteur de dilution
F_0, F_a : fluorescence de l'échantillon avant et après acidification

II.2.2. PRODUCTION PRIMAIRE

II.2.2.1. Protocole de mesure

La production primaire a été estimée par l'incorporation de ^{14}C-bicarbonate (Steeman-Nielsen 1951) en conditions « *in situ* simulées ». Toutes les manipulations étaient effectuées dans des flacons lavés à l'HCl 10%, rincés trois fois à l'eau Milli-Q, séchés et enfin rincés trois fois avec l'eau de prélèvement. Les expérimentations étaient effectuées en évitant l'exposition des échantillons à la lumière vive. Immédiatement après le retour au laboratoire, une série de 7 sous-échantillons était placée en flacon de Polycarbonate (Nalgene, V = 76 ml). Les 5 échantillons destinés à mesurer l'incorporation par la communauté totale (recueillie sur GF/F) recevaient 0,15 MBq de ^{14}C-bicarbonate (Amersham, 60,68 MBq/ml). Les 2 échantillons destinés à mesurer l'incorporation par les communautés >2 et >10 µm recevaient 0,30 MBq de ^{14}C-bicarbonate. Les 5 échantillons « GF/F » étaient placés dans des filets recréant différentes proportions de l'énergie incidente (de 0 à 100%) et mis à incuber dans un bac thermorégulé

(température *in situ*±2°C) exposé à la lumière du jour pendant environ 4 heures, entre 9 et 13 heures. Les 2 autres flacons étaient incubés à 68 % de l'énergie incidente dans les mêmes conditions.

Après incubation, la quantité totale de radioactivité introduite dans les flacons était vérifiée sur plusieurs flacons tirés au hasard. Cinquante µl de chacun de ces flacons étaient prélevés avant toute autre manipulation et placés dans les fioles à scintillation avec 4 ml de liquide scintillant (Packard, Ultima Gold) et 50 µl de Carbosorb (Packard). Le phytoplancton était alors collecté par filtration sur filtres Whatman GF/F, ou Nuclepore de porosité 2 et 10 µm sous très faible dépression (< 7000 Pa). Les filtres étaient placés dans des fioles à scintillation et immédiatement décarbonatés par ajout de 250 µl de HCl (0,5 N). Les fioles étaient placées sur table d'agitation et sous hotte pendant la nuit, puis la quantité de radioactivité assimilée était mesurée après ajout de 4 ml de liquide scintillant. L'efficacité de comptage était déterminée à l'aide d'une série de standards externes quenchés.

Pour le suivi spatial, étant donné le nombre de stations, les incubations étaient effectuées sous une seule énergie incidente (68 %) choisie pour limiter la photoinhibition éventuelle.

II.2.2.2. Calcul de la production primaire

Pour ramener la production primaire " simulée " à la production primaire intégrée (PPI) sur la colonne d'eau, il est nécessaire de :

1. Convertir les pourcentages de luminosité en profondeur équivalente à l'aide du coefficient d'atténuation obtenu grâce aux données de PAR de la sonde CTD.
2. Intégrer verticalement la production sur la totalité de la colonne d'eau (méthode des trapèzes).
3. Corriger les productions du rapport de l'irradiance totale sur la journée à l'irradiance reçue pendant l'incubation[3]. Les données d'irradiance ont été mesurées à l'aide d'un capteur plan de PAR et les lacunes étaient complétées par les données d'irradiance totale de Météo France. La comparaison de nos valeurs de PAR avec l'irradiance totale fournie par Météo France nous a permis d'établir la relation suivante : 1 $E.m^{-2}.d^{-1}$ (PAR) = 0,0212 $J.cm^{-2}.d^{-1}$ (Irradiance totale), avec un r = 0,998.
4. Ramener la production en unité de surface à une production par unité de volume en corrigeant de la profondeur d'intégration (afin de limiter les biais dus aux profondeurs variables des stations pour les analyses de corrélations).

[3] L'augmentation linéaire de la production primaire en fonction de la durée d'exposition pour une irradiance donnée ayant été vérifiée au préalable aux deux stations de degrés trophiques contrastés M33 et N12.

La production à chaque niveau de lumière est calculée par :

$$PP(mgC.m^{-3}) = \frac{dpm_{e-}dpm_b}{dpm_t} \times \frac{Vp \times 1000}{Vf} \times 1{,}05 \times W$$

Avec :
dpm_e : désintégration par minute dans l'échantillon, et dpm_b à l'obscurité
W : concentration en carbonates ($mgC.m^{-3}$)
V_p : volume prélevé pour la mesure de radioactivité introduite (µl)
V_f : volume d'échantillon filtré (ml)
1,05 : fractionnement isotopique entre ^{12}C et ^{14}C

II.2.2.3. Estimation de la concentration des carbonates

Des mesures d'alcalinité totale réalisées par le laboratoire de chimie de l'IRD ont permis de connaître les valeurs caractéristiques du lagon sud-ouest. La valeur moyenne obtenue pour l'ensemble des stations est de 28215 $mgC.m^{-3}$ (σ = 215 $mgC.m^{-3}$, n = 27), sauf pour la station M41 (océanique) où la valeur mesurée est de 28920 $mgC.m^{-3}$.

Pour le suivi spatial, les étapes 1 et 2 du calcul ne sont pas possibles car la mesure n'a été faite qu'à 68 % d'énergie incidente. L'ensemble des données du suivi temporel montre que la production primaire relative à ce pourcentage d'irradiance est en moyenne supérieure à la production primaire totale d'un facteur 1,32 ± 0,07 (n = 68).

II.2.2.4. Reproductibilité de la mesure

La reproductibilité de la mesure a pu être testée selon deux approches différentes :

Cinétique : La reproductibilité de la mesure a été évaluée en effectuant 5 mesures pour la station M33 et N12 aux mêmes conditions de température et d'éclairement, en prélevant les échantillons toutes les 1h30 pendant 7,5 heures. La moyenne des mesures est de 3,6 ± 0,1 $\mu gC.l^{-1}.h^{-1}$ en station M33 et de 13,6 ± 1,5 $\mu gC.l^{-1}.h^{-1}$ pour N12. Le coefficient de variation est de 3 et 11 % pour M33 et N12 respectivement.

Réplicats : Des mesures de production primaire ont été effectuées en réplicats lors du cycle de 48 heures d'Avril 2002. Le coefficient de variabilité (%) moyen (± SE) des réplicats est de 5 ± 1 % pour la station M33 et de 5 ± 2 % pour la station N12.

Ces résultats illustrent la bonne reproductibilité de la mesure de production primaire et justifient l'absence de réplicats en routine.

II.2.3. ABONDANCE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTES PHYTOPLANCTONIQUES

II.2.3.1. Dénombrement des populations picophytoplanctoniques

Immédiatement après le retour au laboratoire, un sous échantillon de 1,5 ml était disposé dans un cryotube de 2 ml et recevait 7,5 µl de glutaraldehyde (SIGMA Grade II). Le cryotube était laissé dans le noir à température ambiante pendant 15 min afin de permettre la consolidation des membranes par le glutaraldéhyde, puis était plongé dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur FACScan (Becton Dickinson) par Jean Blanchot (UR 99, IRD La Réunion). Les échantillons étaient immédiatement analysés suivant la méthode décrite par Blanchot & Rodier (1996) après décongélation à 37°C. Le volume analysé est de 0,1 ± 0,016 ml. Les paramètres, taille et fluorescence, sont calibrés à l'aide de billes étalons (0,95 µm *Polysciences Fluoresbrite Beads*). Pour éviter une sous-estimation du nombre de particules, le nombre de cellules comptées par seconde ne dépasse jamais 500 événements optiques. Les groupes de cellules du picophytoplancton (*Prochlorococcus*, *Synechococcus* et picoeucaryotes) sont identifiés en combinant les différents signaux optiques (fluorescence rouge et orange, diffusions aux petits angles, et aux grands angles). En effet, pour chaque particule, cinq signaux sont enregistrés deux lumières diffusives et trois fluorescentes. Les photomultiplicateurs sont réglés pour quantifier la fluorescence rouge des pigments chlorophylliens, la fluorescence orange des phycoérythrines (et la fluorescence verte, cf. § II.3.1.2.). Les *Prochlorococcus* sont facilement différenciés des picoeucaryotes par leur fluorescence rouge et leurs diffusions sont beaucoup plus faibles. Les *Synechococcus* ont des fluorescences rouges et des diffusions intermédiaires entre celles de *Prochlorococcus* et des picoeucaryotes. L'ambiguïté est levée par l'importante fluorescence orange, liée à la phycoérythrine qui singularise les *Synechococcus.* Chaque signal individuel est stocké et analysé. Tous les paramètres sont collectés en signal logarithmique dans un format texte en utilisant le logiciel Cellquest (Becton Dickinson). Les fichiers sont ensuite analysés par le logiciel Cytowin (Vaulot et al. 1989), http://www.sb-roscoff.fr/ Phyto/cyto.html#Cytowin. La taille maximale des cellules mesurée par la cytométrie en flux est de 2 µm.

II.2.3.2. Dénombrement des populations microphytoplanctoniques

La microscopie est une technique classique de dénombrement des microalgues. La principale critique faite à cette méthode est le temps nécessaire à l'analyse des échantillons

(Garibotti et al. 2003). Le développement de l'étude des pigments photosynthétiques en océanographie voit apparaître de nombreuses études utilisant l'HPLC comme technique d'analyse pigmentaire. L'étude des communautés phytoplanctoniques repose alors sur une analyse chemotaxonomique des pigments photosynthétiques, notamment à l'aide d'un logiciel, CHEMTAX, estimant l'abondance de chaque classe à partir des marqueurs chimiques. Cette méthode est tout d'abord sujette aux limites de la technique HPLC (Mackey et al. 1996). La plus importante étant de devoir suivre en continu les composés séparés et contenus dans la phase mobile. En effet, il faut pouvoir disposer de méthodes et d'appareillages suffisamment sensibles et sélectifs pour déceler en continu de faibles abondances dans une phase mobile.

Les limites majeures de la chemotaxonomie sont :

- Le choix des pigments caractéristiques d'un groupe. La plupart des pigments caractéristiques d'un groupe sont recommandés sur la base d'examens de seulement quelques algues par groupe.
- La faible spécificité de certains pigments utilisés. Par exemple, les pigments d'algues vertes, pigments caractéristiques des diatomées et prymnesiophytes, ont été trouvés dans certains dinoflagellés mettant en évidence une endosymbiose (Jeffrey 1997).
- La nécessité de connaître au préalable la composition taxonomique et les rapports pigmentaires des échantillons analysés. Cette méthode n'était donc pas applicable à notre étude puisque aucune donnée de ce type n'était disponible sur le lagon.

Protocole

L'échantillon (250 ml) était conservé au noir après ajout de formol neutre (concentration finale 2,5%). Le comptage des cellules a été réalisé à l'aide de la méthode classique d'Utermöhl (1958) après concentration à 50 ml à l'aide d'un microscope inverse (Wild M40) par Bruno Delesalle (UMR CNRS 8046, Perpignan). Les comptages étaient effectués au grossissement 300X. Un grossissement supérieur (1500X) a été utilisé pour l'identification des plus petites espèces. La microscopie inversée ne permet pas l'identification de la plupart des espèces phytoplanctoniques, particulièrement les plus petites (comme les coccolithophoridés). Les microalgues sont donc identifiées au niveau de la classe, l'identification du genre ou de l'espèce est rarement possible.

Le biovolume des microalgues a été calculé en utilisant les équations standard proposées par Hillebrand et al. (1999). Les dimensions linéaires utilisées pour les calculs sont obtenues soit à partir des mesures microscopiques, soit dans la littérature (Tomas 1996). Pour chaque taxon, un volume moyen unique était appliqué à tous les échantillons où les taxons sont rencontrés.

II.3. COMPARTIMENT BACTERIEN HETEROTROPHE

II.3.1. ABONDANCE ET BIOMASSE BACTERIENNE

La détermination de la biomasse bactérienne passe par l'estimation préalable de l'abondance bactérienne. Les deux techniques de comptages bactériens ont pu être appliquées sur l'échantillonnage. Les mesures en cytométrie en flux ont été réalisées par J. Blanchot (IRD UR 99, La Réunion) et celles en microscopie à épifluorescence ont été effectuées au centre IRD de Nouméa.

II.3.1.1. Microscopie à épifluorescence

Le marqueur utilisé est le DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, concentration finale 10^{-5} w/v) qui se fixe sur l'ADN. Quand le complexe ADN-DAPI est excité avec une lumière d'une longueur d'onde comprise entre 330 et 380 nm il fluoresce dans le bleu. Le DAPI non spécifiquement fixé sur l'ADN peut fluorescer en jaune pâle. Par rapport à l'acridine orange, ce marqueur améliore la visualisation des bactéries et leur distinction des cyanobactéries de taille inférieure à 1 µm (Porter & Feig 1980). Plus de 400 bactéries ont été dénombrées sur au moins 20 champs pour obtenir un coefficient de variation de la moyenne par champs d'environ 10% (Kirchman 1992).

L'abondance bactérienne (AB) s'obtient en appliquant la formule suivante :

$$AB(10^6 cells.ml^{-1}) = B_T \times \frac{100}{C} \times \frac{1}{c} \times \frac{18319}{V_f} \times \frac{1}{10^6}$$

Avec :
B_T : nombre total de bactéries comptées
C : nombre de carreaux par champs sur lesquels sont dénombrées les bactéries
c : nombre de champs comptés
V_f : volume filtré (ml)
18319 : nombre de champs de 100 carreaux sur un filtre de 25 mm (diamètre de filtration = 1,527 cm)

II.3.1.2. Cytométrie en flux

L'énumération des bactéries hétérotrophes peut aussi s'effectuer par cytométrie en flux après marquage au SYBR-I (concentration finale 10^{-4} w/v) suivant le protocole de Marie et al. (1997). Un photomultiplicateur permet d'enregistrer la fluorescence verte caractéristique de l'ADN marqué par le SYBR green. Le protocole d'analyse reste le même que celui présenté pour le picophytoplancton (cf. § II.2.3.1).

II.3.1.3. Comparaison des deux techniques

L'avantage de la cytométrie en flux face à la microscopie est l'analyse rapide d'un grand nombre d'événements, donnant des résultats avec une meilleure signification statistique. La détermination du biovolume est également beaucoup plus facile que par microscopie lorsqu'elle a été calibrée au préalable (Bouvier et al. 2001).

II.3.1.4. Interprétation en biomasse

La biomasse bactérienne est estimée à partir des abondances et du contenu cellulaire bactérien en carbone. La conversion des abondances bactériennes en biomasse bactérienne, essentielle dès que les abondances ont pu être déterminées avec une précision raisonnable, a suscité et justifie encore de nombreuses études. Les estimations du contenu cellulaire bactérien ont pu être faites par calcul (Watson et al. 1977, Simon & Azam 1989), par modélisation du carbone en milieu océanique (Caron et al. 1995), en analysant par CHN les carbone et azote bactériens retenus sur membrane (Bratbak 1985, Kogure & Koike 1987, Lee & Fuhrman 1987, Nagata & Watanabe 1990, Bjornsen & Kuparinen 1991, Kroer 1994), en analysant par HTCO[4] les carbone et azote bactériens en milieu liquide (Fukuda et al. 1998, Pelegri et al. 1999), en déterminant le contenu protéique bactérien par cytométrie en flux (Zubkov et al. 1999, Posch et al. 2001), ou en analysant le contenu élémentaire des cellules aux rayons X (Heldal et al. 1985, Norland et al. 1995, Fagerbakke et al. 1996, Heldal et al. 1996, Gundersen et al. 2002, Vrede et al. 2002). Les résultats paraissent encore assez contradictoires, à la fois pour des raisons méthodologiques et parce que l'on peut s'attendre à des variations naturelles de ce contenu en fonction de l'espèce et de son état nutritionnel (Vrede et al. 2002). On peut toutefois estimer que le contenu cellulaire de peuplements bactériens naturels varie entre 10 et 30 fgC.cellule^{-1}, ce qui ne représente pas une incertitude plus choquante que celle représentée par le rapport C:Chl.*a* des peuplements phytoplanctoniques (~50-200, Banse 1977, Buck et al. 1996) alors que la concentration en Chl.*a* est largement utilisée pour estimer la biomasse phytoplanctonique.

Le contenu adopté ici est la valeur de 12,8 fgC.cellule^{-1} déterminée par Fukuda et al. (1998) sur des assemblages bactériens océaniques collectés dans le Pacifique Subtropical (15°N) dans des conditions trophiques assez proches de celles prévalant dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie. Ces auteurs sont les premiers à avoir effectué la mesure directe du contenu en carbone des assemblages bactériens marins par analyse HTCO. Cette méthode est plus sensible et nécessite moins de volume d'échantillon que l'analyse CHN (Fukuda et al. 1998).

[4] High Temperature Catalytic Oxidation

II.3.2. PRODUCTION BACTERIENNE

II.3.2.1. Principe

La production bactérienne est généralement mesurée de manière indirecte par l'utilisation de radioisotopes marqués, précurseurs de la synthèse d'ADN ou de protéines. Les deux approches les plus couramment utilisées sont l'incorporation de ^{3}H-Thymidine (Fuhrman & Azam 1982) et l'incorporation de ^{3}H-Leucine (Kirchman et al. 1985). Ces méthodes ont fait l'objet de nombreux débats lors de leur introduction. Certains auteurs ont utilisé les deux méthodes simultanément afin de tester leur cohérence. Leur comparaison montre généralement une bonne corrélation entre les taux d'incorporation et elles donnent des estimations similaires de la production bactérienne dans des environnements aussi diversifiés qu'un estuaire du Delaware (Kirchman & Hoch 1988), la baie de Chesapeake (Chin Leo & Kirchman 1988), les côtes belges, la Seine, l'Yonne et les eaux de distribution du réseau parisien (Servais 1992) ou encore les lagons d'atoll de Polynésie Française (Torréton & Dufour 1996). Par contre, l'incorporation de leucine change plus rapidement que celle de thymidine en réponse à des variations environnementales ce qui peut conduire à des différences ponctuelles (Chin Leo & Kirchman 1988). L'approche en double marquage (^{3}H-thymidine et ^{14}C-leucine) serait plus apte à séparer les changements réels des artéfacts liés à l'approche simple-traceur (Chin Leo & Kirchman 1988). Au cours de cette thèse, la mesure de la production bactérienne a été effectuée avec un fort taux d'acquisition. Aussi, le coût du traceur, la multiplication des analyses et la lourdeur de la réglementation sur la commande et le stockage de radiotraceurs nous ont conduit à n'employer qu'une des deux approches. La mesure par incorporation de ^{3}H-Thymidine a été préférée.

Elle présente les avantages suivants (Bell 1993) :

- La synthèse d'ADN est strictement régulée et reliée à la division cellulaire. La thymidine est rapidement incorporée par les cellules, reste stable pendant l'incorporation, est convertie rapidement en nucléotides.
- Une mesure expérimentale de routine dans des eaux naturelles nécessite l'utilisation de quelques nanomoles par litre de traceurs et une incubation courte ($\leq$ 1 heure). Pour cette concentration et ce temps d'incubation, la thymidine n'est pas incorporée par les cellules eucaryotes et par les cyanobactéries, ainsi dans les eaux naturelles la thymidine est spécifiquement incorporée par les bactéries hétérotrophes. Alors que de récentes études ont

montré que les cyanobactéries marines comme *Nodularia baltica*, *Nodularia sphaerocarpa* (Hietanen et al. 2002) et dulçaquicoles comme *Microcystis aeruginosa* (Kamjunke & Jahnichen 2000) incorporent la leucine. Hietanen et al. (2002) indiquent que d'autres espèces cyanobactériennes marines comme *Anabaena* spp. (présente dans le lagon) et *Aphanizomenon* spp. auraient le potentiel d'incorporer la leucine et recommandent de ne pas l'utiliser lors de blooms de cyanobactéries.

- La mesure de l'incorporation de thymidine est très sensible aux variations environnementales permettant ainsi une analyse spatiale et temporelle fine.

Cependant, Bell (1993) souligne les quelques incertitudes de cette méthode :

- Dans certains environnements, les macromolécules (ARN, protéines, lipides) autres que l'ADN peuvent être marquées. Un test préalable utilisant l'extraction enzymatique des macromolécules (Torréton & Bouvy 1991) effectué sur une large gamme de stations lagonaires aux caractéristiques contrastées montre que 80 % de thymidine est incorporée par l'ADN dans nos conditions d'expérimentations (Septembre 1999, Torréton, non publié).
- La thymidine ajoutée peut être diluée par synthèse *de novo*. En effet, si la concentration de thymidine ajoutée est trop faible, la synthèse *de novo* continue et l'incorporation de thymidine est sous-estimée (Heinänen 1993). Il est donc nécessaire d'opérer à concentration saturante de thymidine pour pallier cet inconvénient (§ II.3.2.2).
- Deux facteurs de conversion sont nécessaires pour exprimer l'incorporation de [^{3}H]-thymidine en production de biomasse bactérienne (Bell 1993) : (1) conversion du nombre de moles incorporées en cellules produites (TCF = Thymidine Conversion Factor) (2) conversion du nombre de cellules produites en unité de carbone (CCF = carbon conversion factor) (§ II.3.2.2).

II.3.2.2. Adaptation aux conditions lagonaires

Concentration saturante de ^{3}H-Thymidine

Pour la plupart des environnements, la concentration finale de 20 nM de ^{3}H-Thymidine est recommandée (Bell 1993). La concentration en ^{3}H-Thymidine saturante peut toutefois varier en fonction du type d'environnement étudié (Bell 1993) et de la physiologie des assemblages cellulaires (Heinanen 1993). Si la concentration en ^{3}H-Thymidine est trop faible, la dilution isotopique peut être significative et variable. A l'inverse, une concentration trop importante peut stimuler la dégradation de la ^{3}H-Thymidine (TdR) et augmenter la proportion de marquage non

spécifique (Torréton & Bouvy 1991) ou l'incorporation par le phytoplancton (Brittain & Karl 1990).

Deux essais de l'incorporation de TdR en fonction de la concentration en TdR finale ont été effectués en Mars 2001 (eau de fond de baie, soumise aux apports anthropiques) et en Avril 2002 (station M33, éloignée des influences anthropiques), Figure II.3. À partir des valeurs réelles, nous avons ajusté une courbe de type Michaelis :

$$V = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$$

Avec :
V : Quantité théorique de thymidine incorporée en $pM.h^{-1}$
V_m : Quantité maximal réelle de thymidine incorporée en $pM.h^{-1}$
S : Concentration de TdR finale nM
K_m : Constante de Michaelis, concentration de TdR finale à $V_m/2$

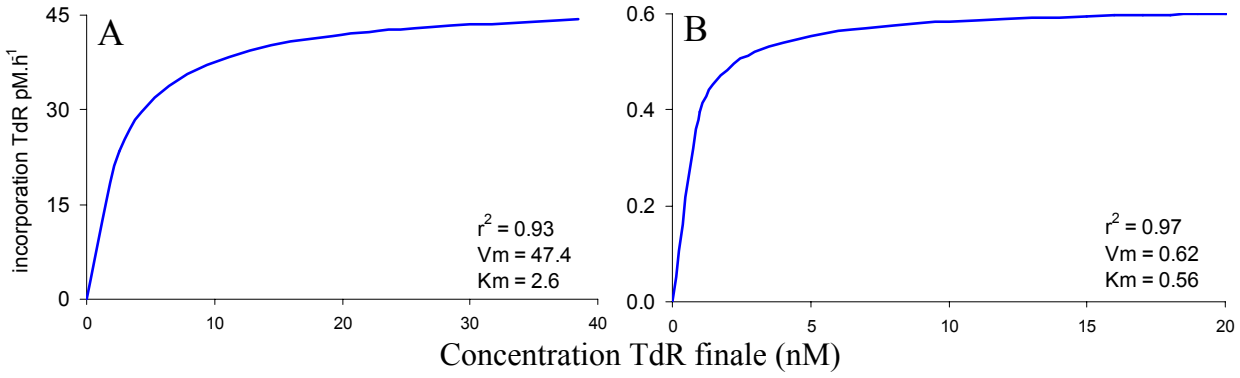


Figure II. 3 - Modélisation (courbe Michaelienne) de l'incorporation de thymidine ($pM.h^{-1}$) en fonction de la concentration ajoutée (nM) en station de fond de baie (Anse Vata) le 16/03/01 (A) et en station M33 le 04/04/02 (B). Vm représente l'incorporation maximale et Km est la constante de Michaelis. r^2 : coefficient de détermination donnant la qualité de l'ajustement de la courbe modélisée aux valeurs réelles.

En employant une concentration en TdR de 15 nM, l'incorporation de TdR représente 85 % du V_m en station de fond de baie très eutrophe (parmi les plus fortes valeurs de production bactériennes mesurées au cours de ce travail), et 96 % du V_m en station M33. Cette concentration a donc été utilisée en routine.

Autoabsorption des β-

L'autoabsorption dans le précipité TCA des radiations faiblement énergétiques du tritium a été déterminée en incubant une série d'échantillons en double. L'un des lots a subi une hydrolyse acide à chaud du précipité TCA (HCl 0,5N, 100°C, 30 min dans des flacons à scintillation en verre) pour supprimer l'autoabsorption et a été comparé au traitement standard sans hydrolyse. L'expérience a été réalisée à plusieurs reprises à deux périodes de l'année et sur des stations de degrés trophiques contrastés (Tableau II.2). Le rapport moyen (± SE) de la radioactivité détectée entre échantillons hydrolysés et non hydrolysés est de 1,27 ± 0,03 et les valeurs des échantillons non hydrolysés, plus simples et plus économiques à effectuer en routine ont été multipliées par ce facteur.

Tableau II.2 - Rapport de la radioactivité ^{3}H-thymidine retenue sur les membranes entre échantillons hydrolysés et non hydrolysés (HCl :nonHCl).

Date	Station	HCl :nonHCl
04/04/01	D01	1,40
	D05	1,25
	D08	1,25
	D16	1,39
	D22	1,22
	D33	1,10
21/06/03	N12	1,21
	N44	1,39
	M33	1,17
	M38	1,24
23/06/03	A26	1,47
25/06/03	A30	1,13

Elimination du marquage des lipides

Une part du marquage peut être retrouvée dans les lipides, principalement au niveau des transporteurs membranaires (Wicks & Robarts 1987). La proportion de ce marquage non spécifique a été estimée en comparant la radioactivité retenue avec et sans rinçage du précipité TCA collecté sur membrane par de l'éthanol à 80%, solubilisant les lipides marqués. L'un des lots a subi un rinçage à l'éthanol (3 ml d'éthanol après le dernier rinçage au TCA) et a été comparé au traitement standard. Les échantillons rincés à l'éthanol ont en moyenne 0,9 ± 0,1 % de radioactivité en plus que les échantillons non rincés. La différence n'est pas significative et le rinçage par l'éthanol a été omis en routine.

Effet de la lumière

Les incubations pour mesurer la production bactérienne au moyen de traceurs ont longtemps été effectuées à l'obscurité, d'autant que les premières comparaisons ne montraient pas de différence significative entre lumière et obscurité pour des incubations de quelques minutes à quelques heures après l'échantillonnage (Bell 1993).

L'irradiance moyenne journalière en Nouvelle-Calédonie est importante (1897 $J.cm^{-2}$, données de 1997-1998, Bujan 2000). Il est certain que les effets des UV sur les activités hétérotrophes sont complexes et probablement très variables. En effet, l'exposition aux UV-B est connue pour endommager l'ADN bactérien et réduire l'activité ectoenzymatique bactérienne (Herndl et al. 1993). Le bactérioplancton semble plus affecté par les radiations que les autres groupes planctoniques (Moran & Zepp 2000), ce qui peut s'expliquer par le fort rapport surface : volume du à sa petite taille et à un manque de pigments protecteurs. A l'inverse, l'exposition aux UV affecte la labilité de la matière organique dissoute et peut la rendre plus dégradable (Miller & Moran 1998)

Estimer cet effet et surtout l'extrapoler sur 24h suppose que les bactéries *in situ* sont exposées au rayonnement pendant un temps égal à celui de l'incubation, ce qui n'est pas facile à démontrer ou infirmer. En effet, si les bactéries sont entraînées en profondeur, elles peuvent se réparer efficacement sous l'influence des UV-A et des radiations photosynthétiquement actives qui pénètrent plus en profondeur que les UV-B. Des mesures dans les lacs nord américains montrent ainsi que les UV-A pénètrent 2,5 fois plus profondément dans la colonne d'eau que les UV-B (Williamson et al. 1996)[5]. L'association de ces longueurs d'onde induit l'expression des photolyases permettant la réparation de l'ADN (Kaiser & Herndl 1997). L'effet des radiations UV sur la production de biomasse du bactérioplancton dépend donc des coefficients d'atténuation spectraux respectifs des UV-A, UV-B et PAR, et de l'équilibre entre les dommages entraînés par les radiations et la photoréparation, lui-même lié aux mouvements passifs des cellules dans la colonne d'eau (Häder et al. 1998). Les activités hétérotrophes ne s'arrêtant pas à l'obscurité, elles sont sûrement moins directement inhibées que les processus autotrophes après intégration dans le temps et dans l'espace (Moran & Zepp 2000).

Cet aspect, qui demande un lourd investissement en matériel et en expérimentations n'a donc pas été traité dans le cadre de ce travail. L'effet des UV sur les processus bactériens dans le

[5] Les premières mesures dans le cadre d'ECCO montrent que les UV-A pénètrent 1,4 fois plus profondément que les UV-B dans les parties oligotrophes du lagon de Nouvelle-Calédonie

lagon SW de Nouvelle-Calédonie est étudié depuis décembre 2004 dans le cadre d'un projet financé par le programme national ECCO (resp. X Mari, UR 103 de l'IRD).

Effet de la température

L'incorporation de ^{3}H-Thymidine fait appel à des réactions enzymatiques dont la vitesse de réaction est fonction de la température. L'analyse du suivi temporel, au cours duquel les températures variaient de 21 à 28°C, doit donc tenir compte de cette variable dans l'explication des variations observées de la production bactérienne.

La valeur de Q_{10} pour la production bactérienne est généralement comprise entre 2 et 3 (Shiah & Ducklow 1994, Tibbles & Harris 1996, Kirchman & Rich 1997, Shiah et al. 1999), excepté lorsque l'on s'approche des températures limitant leur croissance (Pomeroy & Wiebe 2001). Le Q_{10} a souvent été déterminé sur des sites tempérés où les communautés bactériennes sont susceptibles de rencontrer une gamme de température très différente de celle qui prévaut dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie. L'influence de la température sur la production bactérienne a donc été déterminée sur quelques échantillons du lagon SW (stations M33 et N12 du suivi temporel) à différentes saisons.

Protocole expérimental

Les mesures de production bactérienne ont été réalisées comme présentées dans le § II.3.2.3 en réalisant des triplicata par mesure. Les incubations étaient effectuées à 5 températures différentes allant de 20 à 30 °C.

L'activité bactérienne est modélisée en fonction de la température suivant l'équation suivante :

$$\ln(k) = \ln(A) + \left(\frac{-E_a}{R} \times \frac{1}{T} \right)$$

(Isaksen & Jorgensen 1996)

Où :
E_a : Energie d'activation en KJ.mol^{-1},
K : Incorporation de ^{3}H-thymidine en dpm,
A : Constante d'Arrhenius,
R : Constante des gaz parfaits (8,31 J.K^{-1}.mol^{-1}),
T : Température en Kelvin.

A partir de Ea, on peut déduire le $Q_{10(20\text{-}30°C)}$, qui est le rapport entre les vitesses de réactions à 30 et 20°C.

$$Q_{10} = \exp\left(\frac{E_a \times 10}{RT(T+10)}\right)$$

Les coefficients E_a et ln(A) sont obtenus à partir des relations empiriques (Figure II.4.a) linéarisées (Figure. II.4.b).

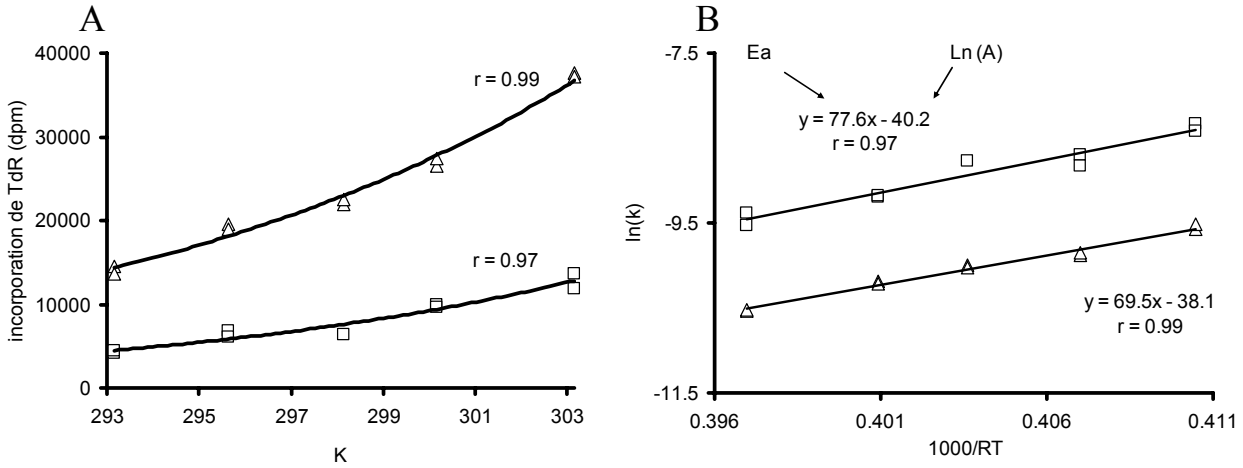


Figure II.4 - (A) Relations entre incorporation de TdR (dpm) et température (K en kelvin) pour les stations N12 (Δ) et M33 (□), le 12 décembre 2001. (B) Détermination des constantes de l'équation d'Arrhenius. E_a est l'énergie d'activation en $kJ.mol^{-1}$, A est la constante d'Arrhenius

Le Tableau II.3 présente les coefficients des relations d'Arrhenius et les Q_{10} obtenus au cours des différents essais.

Tableau II.3 - Constantes de l'équation d'Arrhenius pour la production bactérienne. $Q_{10(20\text{-}30°C)}$ est le rapport entre les vitesses de réactions à 30 et 20°C, r^2 est le coefficient de détermination, E_a est l'énergie d'activation en $kJ.mol^{-1}$, A est la constante d'Arrhenius.

	12-12-01	2-7-02	4-7-02	24-10-02	21-1-03	12-12-01	2-7-02	24-10-02	21-1-03
Ea	77,6	29,7	54,8	42,7	34,6	69,5	63,6	71,9	60,5
Ln (A)	-40,2	-18,7	-30,8	-26,0	-20,9	-38,1	-32,5	-38,4	-34,3
Q_{10}(20-	2,9	1,5	2,1	1,8	1,6	2,6	2,4	2,7	2,3
r^2	0,95	0,96	0,98	0,96	0,96	0,99	0,88	0,99	0,99

Certaines valeurs de Ea (station M33 : 2-7-02, 4-10-02 et 21-1-03) sont inférieures aux autres valeurs obtenues, sans que la qualité des mesures soit en cause (r^2 comparables) et sans raison identifiée à ce jour. Le Ea moyen (±SE) de 56,1 ± 5,3 $kJ.mol^{-1}$ correspondant au Q_{10}(20-30°C) moyen de 2,19 ± 0,15 a donc été employé.

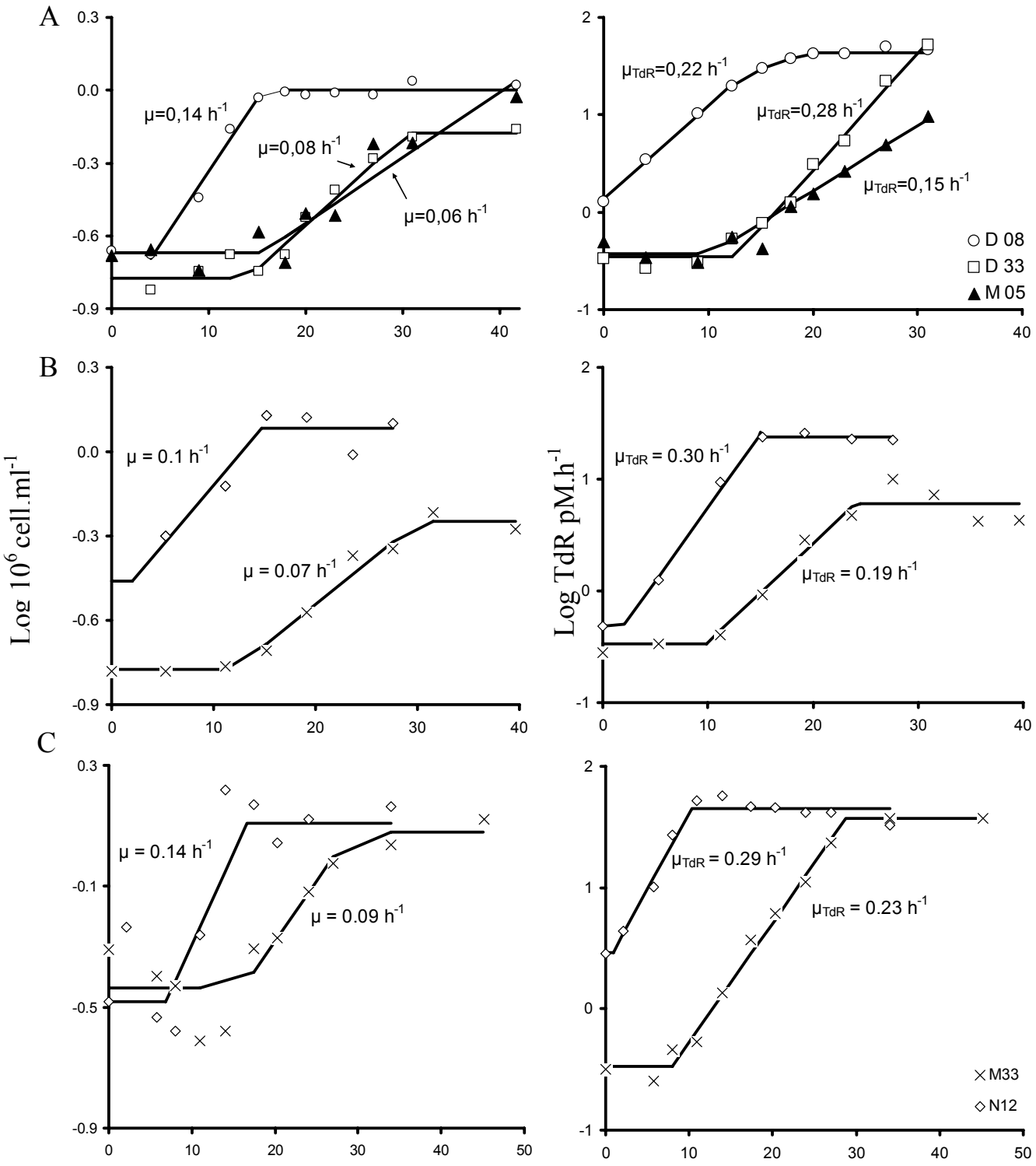


Figure II.5 - Abondance bactérienne et incorporation de thymidine au cours des étalonnages. A : 28 mars 2001, B : 16 juillet 2002, C : 5 février 2003. μ est le taux de croissance bactérien calculé à partir de l'abondance, μ_{TdR} est le taux de croissance bactérien déduit de l'incorporation en TdR.

Facteurs de conversion

TCF Thymidine Conversion Factor

La réalisation d'un étalonnage permet de relier empiriquement la production de cellules à l'incorporation de thymidine. Pour cela, sur des assemblages bactériens naturels, il est nécessaire de découpler la production bactérienne et les contrôles exercés sur celle-ci (prédation, limitation nutritive) de façon à obtenir une croissance bactérienne nette. En parallèle est réalisé le suivi de l'incorporation de thymidine afin de le relier ensuite à la production nette de cellules. La démarche suivante a été appliquée à des périodes différentes et sur des sites de richesses contrastées pour représenter l'ensemble de nos stations de prélèvements :

- Préparation d'un inoculum bactérien débarrassé des prédateurs en filtrant sans dépression sur membrane Nuclepore de porosité 0,6 µm. Bien entendu, cette manipulation n'enlève pas les virus bactériophages (Kirchman & Ducklow 1993).
- Dilution de cet inoculum (20% du total) dans l'eau du même milieu filtrée sur membrane de porosité 0,2 µm (ester de cellulose Millipore), afin de supprimer une éventuelle limitation nutritive et limiter la probabilité de rencontre entre virus et bactéries.
- Mise en culture avec agitation modérée à température *in situ* et à l'obscurité.

L'échantillonnage était effectué toutes les trois à cinq heures pour déterminer l'abondance cellulaire et l'incorporation de thymidine. La Figure II.5 présente la croissance bactérienne nette obtenue sur chaque culture. Après une période de latence de durée variable, les cultures présentent une phase exponentielle suivie d'un plateau, excepté pour la station M05. La Figure II.5 montre que l'incorporation de TdR présente aussi ces trois phases, mais avec des durées de latence et des taux d'accroissement différents de ceux obtenus pour la croissance bactérienne. Ducklow & Carlson (1992) proposent un calcul (Equation II.1) des facteurs de conversion qui n'est pas applicable dans notre cas car il suppose qu'il n'y a pas de phase de latence. L'intérêt et les limites des différentes méthodes de calcul ont été discutés par Torréton & Dufour (1996).

La démarche choisie ici est la méthode intégrative (Equation II.2), la plus adaptée lorsqu'il y a un décalage entre la croissance bactérienne et l'incorporation de thymidine (Kirchman & Hoch 1988). Cette approche consiste à relier la production nette des cellules entre début des cultures et arrivée au plateau avec l'incorporation de TdR intégrée sur la même période (Tableau II.4).

La difficulté dans la méthode intégrative est de choisir la période d'incubation à utiliser pour effectuer l'intégration. Nous avons décidé d'effectuer la moyenne des valeurs initiales de la phase de latence pour le T_0 et la moyenne des valeurs finales pour le plateau de fin d'intégration, le temps final correspondant au début du plateau (pour la culture M05 la plateau n'ayant pas été obtenu, le dernier point a été utilisé).

Équation II.1 - Calcul du facteur de conversion incorporation de thymidine – production de cellules (Ducklow & Carlson 1992)

$$CF = \mu \frac{N_0}{T_0}$$

avec :
μ : taux de croissance (h^{-1})
N_0 : Abondance cellulaire en début de culture ($cell.ml^{-1}$)
T_0 : Taux d'incorporation de thymidine en début de culture ($pM.h^{-1}$)

Équation II.2 - Calcul du facteur de conversion incorporation de thymidine – production de cellules, Méthode intégrative (Riemann et al. 1987)

$$CF = \frac{N_f - N_0}{\int TdR \cdot dt}$$

avec :
N_0, N_f : abondance bactérienne initiale et finale
$\int TdR \cdot dt$: taux de TdR incorporée

Tableau II.4 – Production cellulaire nette, incorporation de TdR intégrée, et rapport de la production nette à l'incorporation de TdR.

Variables	D 08 5-2-01	D 33 5-2-01	M 05 5-2-01	M33 16-7-02	M33 5-2-03	N12 16-7-02	N12 5-2-03
production cellulaire nette (10^6 $cell.l^{-1}$)	774	519	728	399	835	869	959
incorporation de TdR intégrée (10^{-12} $mol.l^{-1}$)	258	230	211	83	769	302	394
production nette:incorporation de TdR (10^{18} $cell.mol^{-1}$)	3,0	2,3	3,5	4,8	1,1	2,9	2,4

Les facteurs de conversion déterminés au cours de ce travail se situent dans les valeurs élevées de la littérature. Celles-ci, examinées par Ducklow & Carlson (1992) sont très variables entre 0,1 et 60 10^{18} cell.mol^{-1}, 74 % des valeurs (n = 97) se situant entre 1 et 4 10^{18} cell.mol^{-1}. Le TCF utilisé couramment est 2 x 10^{18} cell.mol^{-1}, ce facteur étant la valeur médiane de 97 études marines (Ducklow & Carlson 1992). La valeur moyenne (± SE) de nos différentes déterminations 2,85 ± 0,4 x 10^{18} cell.mol^{-1} a été adoptée. Elle est différente de la valeur généralement employée par défaut, ce qui montre la nécessité de la déterminer pour chaque nouveau lieu d'étude.

CCF Carbon Conversion Factor

Le contenu en carbone dans les cellules bactériennes utilisé dans ce travail de thèse (12,8 fgC.cellule^{-1}, Fukuda et al. 1998) est différent de celui utilisé dans Briand et al. 2004 (20 fgC.cellule^{-1}, Lee & Furhman 1987). La détermination du contenu en carbone cellulaire n'a pu être faite dans le cadre de cette thèse. La valeur longtemps utilisée était celle de 20 fgC.cellule^{-1}. Fukuda et al. (1998) montrent que cette valeur est surestimée dans les milieux océaniques oligotrophes et déterminent 12,8 fgC.cellule^{-1} dans une zone du Pacifique subtropical (cf. § II.3.1.4.), de degré trophique proche de celui des eaux du lagon SW de Nouvelle-Calédonie. Cette valeur a donc été préférée pour calculer la production bactérienne dans l'ensemble de ce travail de thèse.

II.3.2.3. Protocole de routine (Figure II.6)

Entre 5 ml (stations riches) et 10 ml (stations pauvres) d'eau du milieu étaient incubés en duplicata avec 100 µl de ^{3}H-Thymidine (Amersham TRK 637, 1,5-2,2 TBq.mmol^{-1}, concentration finale 15 nM) dans des tubes en polystyrène fermés hermétiquement. Après une heure d'incubation (linéarité vérifiée au préalable au delà de 90 minutes) à la température *in situ* (± 1°C), à l'obscurité, l'incorporation est arrêtée au formol (37 % tamponné au Borate de Na). Pour chaque duplicata, un témoin formolé avant l'addition de ^{3}H-thymidine est réalisé. Après arrêt de l'incubation, les bactéries sont collectées par filtration sous faible dépression (10^{4} Pa) sur membranes en polycarbonate (Nuclepore) de porosité 0,2 µm préalablement imbibées de thymidine non radioactive (10 mM). Le vide est alors rompu et les macromolécules sont précipitées avec de l'acide TriChloroAcétique (TCA 5% w/v) dans les tourelles à filtration. Après quinze minutes à 4°C, le vide est rétabli et les membranes sont rincées trois fois avec 5 ml de TCA 5 % froid.

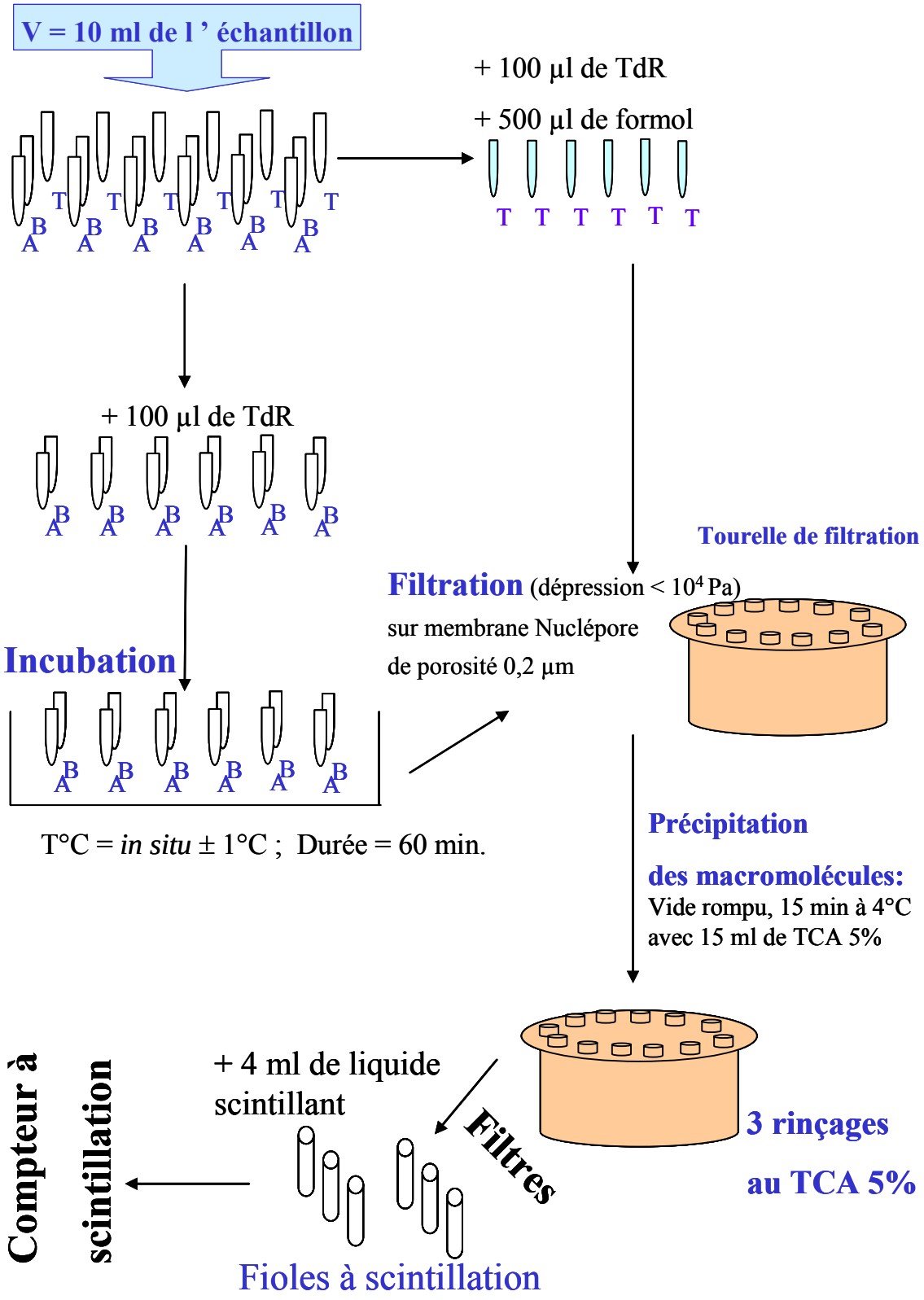


Figure II.6 – Protocole de mesure de la production bactérienne

Les filtres sont placés dans des fioles à scintillation avec 4 ml de liquide scintillant. La quantité de radioactivité incorporée par les bactéries est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. La différence entre réplicats représente en moyenne 0,32% de leur valeur. L'efficacité de comptage est déterminée à l'aide d'un standard externe.

La ^{3}H-thymidine présente l'inconvénient de se radiolyser assez rapidement. Un nouveau lot était donc commandé tous les 2 mois. L'incorporation pour chaque nouveau lot était systématiquement comparée au lot précédent et n'a pas montré de différence significative pour cette durée de stockage à 4°C.

II.3.2.4. Calcul de la production bactérienne

La production bactérienne est calculée selon l'expression :

$$PB\left(pM.h^{-1}\right) = \frac{(dpm_{réplicats} - dpm_{blanc})}{2{,}22 \times 10^{12}} \times \left(\frac{1000}{V_f}\right) \times \left(\frac{60}{T}\right) \times \frac{1}{AS} \times 10^{-12} \times 1{,}27$$

Avec :

$dpm_{réplicats}$: Radioactivité moyenne des réplicats
dpm_{blanc} : Radioactivité du témoin (valeur moyenne : 106 dpm)
V_f : Volume d'échantillon filtré (ml)
T : Temps d'incubation (min.)
AS : Activité spécifique de la solution mère de TdR (Ci/mole)
$2{,}22 \times 10^{12}$: Nombre de dpm par Ci
10^{-12} : Conversion des moles en pmoles
1,27 : Correction de l'autoabsorption des β^-

et

$$PB\ (\mu gC.l^{-1}.h^{-1}) = PB\ (pM.h^{-1}) \times TCF \times CCF \times 10^{3}$$

Avec :
TCF : $2{,}58 \times 10^{18}$ cell.mol^{-1}
CCF : 12,8 fgC.cell^{-1}

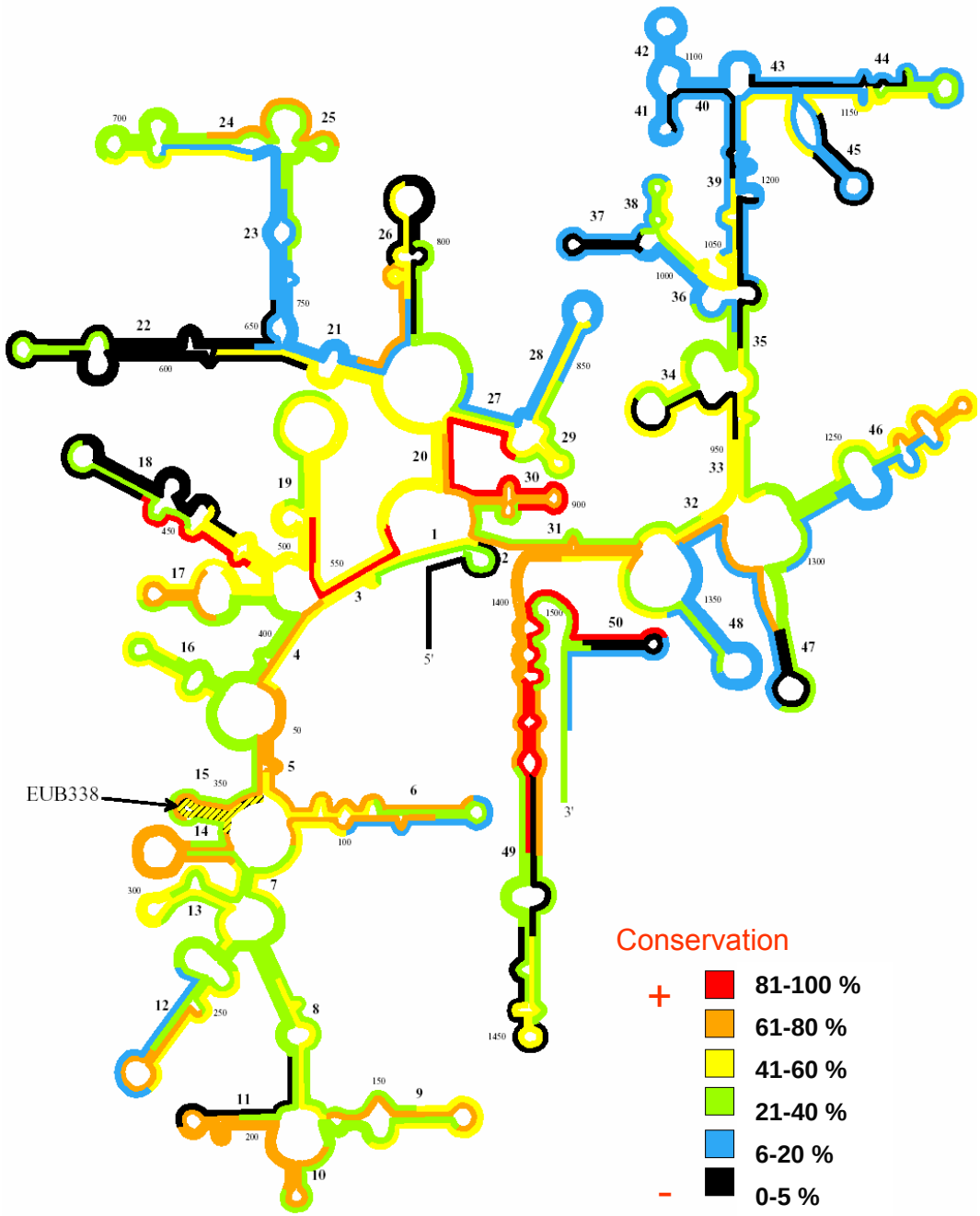


Figure II.7 – Structure secondaire modélisée du gène codant pour l'ARNr 16S. Les zones les mieux conservées entre les organismes sont en rouge (de 81 à 100 % de conservation) et les plus variables en noir (de 0 à 5 % de conservation), extrait du site web http://prion.bchs.uh.edu/Signature16S/Molecule.html ©2002 Dr. George E. Fox.

II.3.3. STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

II.3.3.1. Principe de la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

Il est un fait admis que les techniques traditionnelles (culturales) de microbiologie ne sont pas adaptées à l'évaluation de la composition des communautés bactériennes marines. Ceci est d'autant plus vrai dans les milieux oligotrophes où les bactéries ne sont pas adaptées pour croître sur des milieux enrichis (Giovannoni & Rappé 2000). Ces techniques longues et laborieuses permettent d'identifier les bactéries capables de former des colonies sur des milieux de culture ce qui ne représente qu'un faible pourcentage du nombre total de cellules détectées par observation directe (typiquement 0,1 à 1%, Staley & Konopka 1985). Le séquençage de l'ADN, et notamment celui des gènes ribosomaux, a permis la révision de la systématique bactérienne (Woese 1987). Le gène codant pour les ARN ribosomaux 16S comprend des régions hautement conservées entre tous les organismes, ainsi que des régions de séquence nucléotidiques variables permettant la définition de différents niveaux phylogénétiques (Figure II.7). Dans le cadre de cette étude, la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) a été utilisée pour décrire les communautés bactériennes dans le lagon.

La T-RFLP, développée par Liu et al. (1997), permet une description de la dynamique des communautés bactériennes, par la mise en évidence du polymorphisme de taille des fragments terminaux de restriction (T-RFs). A partir de l'ADN total extrait, les ADNr16S sont obtenus par amplification PCR à l'aide d'amorces universelles. La longueur de ces T-RFs, discriminée par électrophorèse sur gel de séquençage, varie selon la position de la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme. Des sous-populations bactériennes peuvent ainsi être représentées par la taille en paires de bases (pb) de leurs fragments de restriction terminaux respectifs et l'intensité du pic est, en principe, proportionnelle au nombre de gènes présents. Il est important de rappeler que le nombre de gènes codant pour l'ARN16S peut varier d'une espèce bactérienne à une autre. Ainsi, chez *Escherichia coli* l'expression des ces gènes est contrôlée par 7 opérons dont il existe plusieurs copies par cellule. La T-RFLP reste donc semi quantitative et l'on parle d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU en anglais) ce qui peut regrouper plusieurs espèces lorsque les fragments terminaux présentent la même longueur.

Cette technique permet la comparaison d'un grand nombre d'échantillons en un temps relativement court.

Echantillonnage

Filtration

2l eau de mer sur
filtres 1,2 et 0,2 µm placés en série

Extraction de l'ADN

Vérification sur gel d'agarose

PCR

avec amorces marquées

8FTet et 1489R Hex

Vérification sur gel d'agarose

Purification

Élimination des amorces

Digestion

Enzyme Hae III

Dénaturation 10 min à 95°C

Séparation des T-RFs par **Genescan**

Figure II.8 – Protocole de la T-RFLP

II.3.3.2. Protocole (Figure II.8)

Echantillonnage

Dès le retour au laboratoire, 2 litres d'eau ont été filtrés (P<20 mmHg) au travers de membranes stériles de 1,2 µm et 0,2 µm (Sartorius) placées en séries, qui représentent respectivement les bactéries attachées aux particules et les bactéries libres. Les membranes sont stockées dans des cryotubes immédiatement placés dans l'azote liquide.

En raison du coût analytique élevé, une sélection des échantillons à analyser pour l'étude de la diversité bactérienne a été nécessaire. Un premier objectif étant d'examiner si les variations des conditions trophiques se traduisaient par des modifications communautaires, une gamme de conditions trophiques contrastées était recherchée. La productivité bactérienne étant un révélateur sensible des conditions trophiques perçues par les bactéries, la sélection s'est faite sur ce critère. Parmi les 3 séries échantillonnées, les radiales effectuées au mois de janvier 2003 montrent la plus large gamme de productivité bactérienne (facteur 63) et ont donc été analysées. Un deuxième objectif étant d'examiner les variations temporelles des peuplements, les analyses ont été effectuées sur les échantillons de la station M33 éloignée de toute influence anthropique, industrielle et terrigène.

Extraction de l'ADN génomique

Les filtres sont coupés à l'aide d'une lame chirurgicale stérile avant de les placer dans des tubes stériles. L'extraction de l'ADN génomique des échantillons est alors réalisée à l'aide du kit *UltraClean™ Soil DNA isolation kit*, MoBio Laboratories, selon les recommandations du fournisseur. Ce kit combine une lyse cellulaire mécanique par broyage et une lyse enzymatique.

Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La PCR (Figure II.9) permet d'amplifier un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques (Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986). Elle repose sur la synthèse d'ADN par une Taq polymérase thermostable (*Hot Start Taq polymerase*, Qiagen) à partir de deux amorces de polarités opposées et dont la séquence est complémentaire de chacune des bornes du fragment à amplifier. Pour la T-RFLP, des amorces fluorescentes portant en 5' un fluorochrome (phosphoramidites telles que TET : 5-tétra-chloro-fluorescéine et HEX : 5-hexa-chloro-fluorescéine) ont été utilisées.

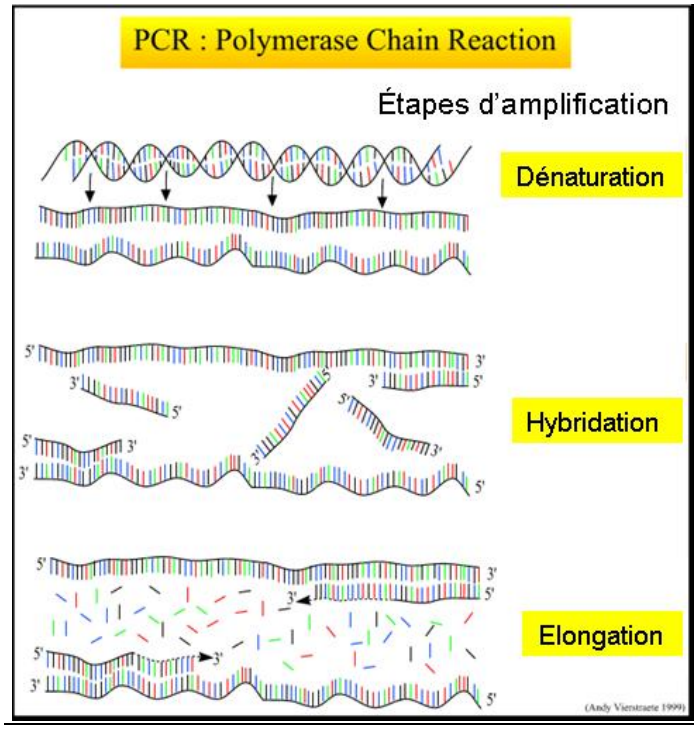


Figure II.9 - Etapes d'amplification de la PCR (extrait du site web http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp).

Milieu réactionnel

Le choix d'utiliser un mélange réactionnel commercial (*Hot Start Taq master mix*, Qiagen) contenant au préalable, l'enzyme, le tampon de réaction, le $MgCl_2$, et les 4 désoxyribonucléotides (dNTPs), permet d'éviter de nombreuses étapes de transferts de produits et donc de diminuer les risques de contamination. L'utilisation a néanmoins été optimisée à partir des recommandations du fournisseur (dilution au ¼), la Taq polymérase et les dNTPs en excès entraînant des amplifications aspécifiques.

Les composantes du milieu réactionnel de PCR d'un volume final de 50 µl sont :

- Hot Start Taq Master Mix (Taq polymérase 0,625 U ; $MgCl_2$ 0,375 mM ; Tampon réactionnel 1X ; dNTPs 50 µM) 12,5 µl
- Oligonucléotides 1 & 2 : 0,5 µl (0,5 µM final)
- $MgCl_2$, 2 nM final : 1,5 µl
- ~ 10 ng.µl^{-1} d'ADN_g (ADN génomique = ADN extrait)
- H_2O stérile qsp 50 µl

Les oligonucléotides utilisés (Tableau II.5) sont des amorces universelles eubactériennes. La taille des amplicons attendus est de 1481 pb.

Tableau II.5 - Séquences des amorces ciblant le gène ADNr 16S

Amorces	Séquences (5'→3')	Références	Gène ciblé	Spécificité
8f 1489r	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG TAC CTT GTT ACG ACT TCA	(Lane 1991) (Weisburg 1991)	*ADNr 16S*	Eubactéries

Conditions d'amplification

L'amplification est effectuée à l'aide d'un thermocycleur PTC-200 (MJ Research, USA) selon le programme suivant :

- Hot Start (dénaturation de l'ADN et activation de l'enzyme) : 95°C pendant 15 min.
- 35 cycles d'amplification :
  a) dénaturation de la matrice d'ADN à 95°C pendant 1 min.
  b) hybridation des amorces à la température d'hybridation appropriée (50°C<Tm<60°C) pendant 1 min
  c) élongation des amorces par l'ADN polymérase à 72°C pendant 1 min.
  d) élongation finale à 72°C pendant 10 min.

L'analyse du rendement et de la spécificité des produits PCR est ensuite réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose de 1 % en fonction de la taille des fragments attendus.

Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments chargés négativement migrent vers l'anode. Le gel d'agarose 1% est utilisé dans un tampon TAE 1X (Tris 90 nM, Acide acétique 90 nM, EDTA 2,5 nM) sous une tension de 100 V durant 30 minutes. 2 µl de tampon de charge sont ajoutés à 5 µl d'ADN. Un marqueur de taille migre en parallèle afin de pouvoir estimer la taille des fragments observés. Ce marqueur est le phage λ (Q-Biogène) digéré par les enzymes de restriction Hind III et Eco RI.

Purification des produits PCR

Les produits PCR en solution sont purifiés à l'aide du kit commercial *GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech). Cette purification a pour but de séparer le fragment d'ADN amplifié du reste des composants du milieu de réaction (protéines, sels, etc.) et notamment des autres acides nucléiques (amorces non utilisées, amplification de séquences non désirées inférieures à 100 paires de bases, etc.).

Digestion enzymatique

Après purification, les produits issus de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique afin d'étudier le polymorphisme des fragments amplifiés au sein de différents échantillons.

L'enzyme de restriction utilisée (Hae III) reconnaît un site spécifique de clivages à 4 paires de bases et présente ainsi une fréquence de coupure importante (4^4=256 paires de bases). L'enzyme coupe au niveau des sites 5'...GG▼CC...3' / 3'...CC▲GG...5'

La digestion a été réalisée dans le tampon réactionnel préconisé par le fournisseur avec 10 unités d'enzymes (dans 1 µl) pour digérer environ 1 µg d'ADN amplifié. L'incubation dure 3h à la température optimale d'activité de l'enzyme utilisée (37°C).

Electrophorèse capillaire

Les produits de digestion combinés avec de la formamide (agent dénaturant) et un standard de taille TAMRA 500 sont séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (*ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems) (étapes 4 et 5, Figure II.10). Après une injection électrocinétique de l'échantillon pendant 30 secondes dans un capillaire contenant un gel polymère adapté (gel de polyacrylamide *Pop4*, Applied Biosystems), la migration est effectuée sous une tension de 15 kV pendant 30 minutes à 60°C. Cette migration entraîne alors la séparation des différents fragments de restriction selon leur taille. Les fragments passent devant une fenêtre où un laser excite les fluorochromes présents. Seuls les fragments de restriction en position terminale (T-RFs) sont détectés, car ils contiennent l'amorce fluorescente. Une analyse préliminaire des électrophorégrammes est réalisée grâce au logiciel Genescan v3,0 (Applied Biosystems) permettant de déterminer les tailles des différents fragments détectés.

Remarque : Le choix d'un TAMRA 500 plutôt que 2500 est lié au type d'enzyme utilisé. Dans notre cas, l'enzyme utilisée ayant une fréquence théorique de coupure élevée (toutes les 256 pb), les fragments obtenus sont donc dans leur immense majorité inférieurs à 500 pb.

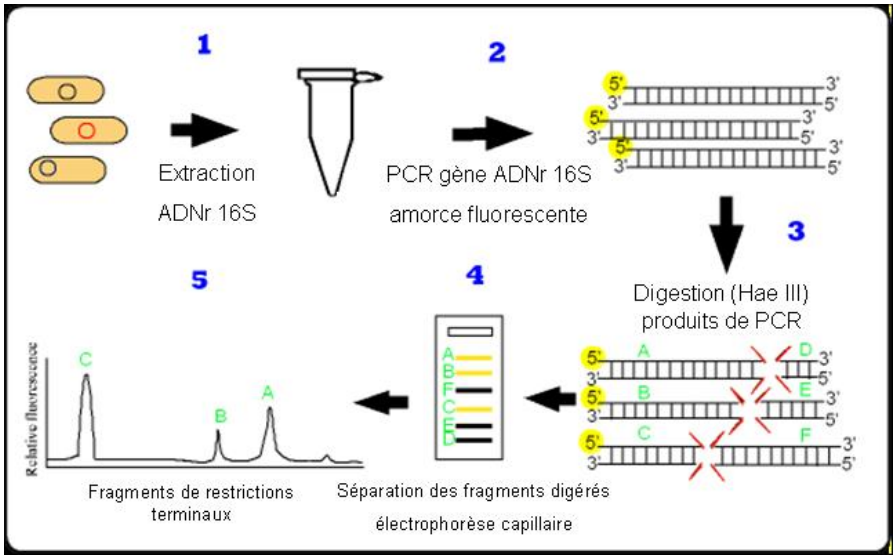


Figure II.10 – Différentes étapes de la T-RFLP, extrait du site web: http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp).

II.4. VARIABLES DESCRIPTIVES DU MILIEU

II.4.1. NUTRIMENTS

II.4.1.1. Ammonium (NH_4^+)

La concentration en ammonium est déterminée par fluorimétrie, selon la méthode utilisant l'*o*-phtaldialdehyde (Holmes et al. 1999). Trois à quatre réplicats de 40 ml par échantillon sont collectés et 2 ml de réactif (*o*-phtaldialdehyde) sont immédiatement ajoutés. La réaction de complexation se déroule sur 6 heures dans le noir à température ambiante. Le dérivé iso-indol produit est dosé à l'aide d'un fluorimètre Turner TD-700 équipé d'un filtre d'excitation à 365 nm et d'un filtre de réception entre 410 et 600 nm. Les concentrations en NH_4^+ sont calculées à partir d'une droite étalon établie à l'aide de concentrations connues pour chaque nouveau lot de réactif (toutes les 2 semaines). Cette procédure assure un coefficient de variation (CV) entre réplicats allant de 30 % pour les sites les plus oligotrophes ($NH_4^+ < 10$ nM) à 5 % pour les sites les plus eutrophes ($NH_4^+ > 500$ nM).

II.4.1.2. Nitrates, nitrites, phosphates (NO_3^-+NO_2^-, PO_4^{2-})

Deux échantillons de 40 ml sont stockés dans des flacons en polypropylène et mis à congeler immédiatement jusqu'à l'analyse. Les nitrates sont ensuite réduits en nitrites suivant la méthode de Wood et al. (1967), et la somme des concentrations de nitrates et nitrites (NO_3^-+NO_2^-) est déterminée d'après Raimbault et al. (1990) au moyen d'un autoanalyseur (*Bran+Luebbe Autoanalyzer III*). Avec cette procédure, le CV entre réplicats est en moyenne de 8% aux sites les plus oligotrophes (NO_3^-+$NO_2^- < 40$ nM) et de 3 % aux sites les plus eutrophes (NO_3^-+$NO_2^- >$ 200 nM). Les concentrations en phosphate sont déterminées d'après Grasshoff et al. (1983) sur le même autoanalyseur. Le CV entre réplicats est en moyenne de 11% aux sites les plus oligotrophes ($PO_4^{2-} < 20$ nM) et de 6 % aux sites les plus eutrophes ($PO_4^{2-} > 100$ nM).

II.4.1.3. Silicates

Un sous échantillon de 60 ml est stocké dans un flacon en polypropylène et congelé immédiatement jusqu'à l'analyse. Les silicates sont ensuite complexés avec les ions molybdates pour former l'acide silicomolybdique. Ce complexe jaune est réduit par un mélange de métol (sulfate de méthyl para amino-phénol) et de sulfite de sodium pour former un complexe silicomolybdique bleu intense. Ce complexe est mesuré par dosage colorimétrique à l'autoanalyseur Bran+Luebbe (Mullin & Riley 1955, modifiée par Fanning & Pilson 1973). Dans

les conditions de réaction, l'ensemble des silicates (colloïdaux et dissous) sont mesurés (Koroleff 1976).

II.4.1.4. Azote et phosphore organique dissous

Deux échantillons de 120 ml sont stockés dans des flacons en polypropylène et congelés immédiatement jusqu'à l'analyse. La matière organique est minéralisée par oxydation en voie humide (Raimbault et al. 1999) et nitrates et phosphates sont alors mesurés par colorimétrie comme décrit précédemment pour estimer l'azote et le phosphore totaux. Les concentrations des formes organiques dissoutes sont calculées en retranchant les formes minérales dissoutes et l'azote ou le phosphore particulaires.

II.4.1.5. Carbone et azote organique particulaire

Le matériel particulaire est collecté par filtration (750 ml) sur des membranes Whatman GF/F (porosité nominale 0,7µm, diamètre 25 mm) préalablement calcinés à 450 °C pendant 2 heures. Le filtre est plié en deux puis déposé sur une feuille d'aluminium épaisse préalablement calcinée. L'ensemble est placé dans une étuve à 50°C. Après 24h, l'aluminium est plié et l'échantillon est stocké dans un dessiccateur jusqu'à l'analyse. La méthode utilisée est la combustion de la matière organique par l'oxygène suivi d'un dosage du dioxyde de carbone par un analyseur CHN Perkin Elmer 2400.

II.4.1.6. Phosphore organique particulaire

Le matériel particulaire est collecté par filtration (1000 ml) sur des membranes Whatman GF/F préalablement autoclavées. Le filtre est plié en deux puis déposé sur une feuille d'aluminium épaisse préalablement calcinée. L'ensemble est placé à -20°C jusqu'à l'analyse. Le phosphore organique particulaire est complexé avec le molybdate d'ammonium pour former le phosphomolybdate d'ammonium, puis est réduit par l'acide ascorbique. Ce complexe est mesuré par dosage colorimétrique à l'*autoanalyseur* III Bran+Luebbe (Mullin & Riley 1955).

II.4.2. VARIABLES PHYSIQUES ET METEOROLOGIQUES

II.4.2.1. Caractérisation de l'eau prélevée

Les variables physiques ont été acquises à chaque prélèvement à l'aide d'une sonde CTD SEABIRD SBE 19. La sonde CTD est composée de 3 capteurs qui permettent de mesurer la conductivité, la température et la pression en chaque station. Des capteurs supplémentaires sont utilisés :

- Un fluorimètre qui permet la détermination *in situ* de la concentration en chlorophylle.
- Un capteur de PAR (Photosynthetically Active Radiation) afin de déterminer l'atténuation lumineuse en fonction de la profondeur.
- Un néphélomètre qui mesure la turbidité.

La sonde CTD, fixée à une corde, est descendue manuellement à vitesse régulière, elle acquière les paramètres hydrologiques obtenus par les différents capteurs, avec une fréquence de 2 mesures par seconde. Les données sont ensuite traitées pour éliminer les valeurs aberrantes. La valeur enlevée est recalculée par pondération avec les valeurs correspondant aux profondeurs directement supérieure et inférieure.

II.4.2.2. Vent

Le centre Météo France de Nouméa enregistre les données de vent sur trois stations : Faubourg Blanchot (ville de Nouméa), baie de Magenta (ville de Nouméa) et au phare Amédée (proche de la passe de Boulari, lagon Sud). Bujan (2000) a montré une forte corrélation entre les données de vent des trois stations de mesures sur 9 années de mesures journalières. L'utilisation d'une seule station de mesure fournit donc une estimation du vent suffisante sur le lagon. Dans le cadre de ce travail de thèse, les relevés de Météo France à la station du Faubourg Blanchot et les relevés de la station IRD à l'îlot Maître (proche de la station M33) ont été utilisés.

La direction (°) et la vitesse ($m.s^{-1}$) du vent relevées par Météo France correspondent à la valeur maximale du vent moyen enregistré sur 10 min, alors que pour les données de l'IRD ce sont les valeurs moyennes du vent enregistré sur 10 min.

Les données de Météo France ont été utilisées pour compléter les valeurs manquantes de la station IRD, endommagée à certaines périodes de l'année. Les relations entre les stations Météo France et IRD sont :

- **direction îlot Maître** (°) = 0,76 × **direction Faubourg Blanchot** (°) + 23,58, où : $r = 0,83$, $n = 416$, $p < 0,001$
- **vitesse îlot Maître** ($m.s^{-1}$) = 1,10 × **vitesse Faubourg Blanchot** ($m.s^{-1}$) – 3,51, où : $r = 0,81$, $n = 421$, $p < 0,001$

II.4.2.3. Lumière

Un capteur de PAR enregistrait en continu l'irradiance instantanée ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) reçue près du bac d'incubation des échantillons pour la mesure de production primaire. Ces valeurs instantanées étaient intégrées sur la durée d'incubation et sur la journée.

CHAPITRE III

Dynamique temporelle des communautés planctoniques

CHAPITRE III. DYNAMIQUE TEMPORELLE DES COMMUNAUTES PLANCTONIQUES

Temporal dynamics of planktonic communities (Southwestern lagoon, New Caledonia)[6]

Séverine JACQUET, Jean-Pascal TORRETON, Vincent FAURE, Enora BRIAND, Olivier PRINGAULT

III.1. RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

L'urbanisation croissante et le développement de l'industrie minière sont à l'origine d'apports croissants en nutriments et en métaux dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Le bactérioplancton et le phytoplancton constituent des voies d'entrée privilégiées de ces apports dans les réseaux trophiques. Comprendre et anticiper les conséquences des ces apports sur le lagon sud-ouest nécessite, en premier lieu, de connaître l'importance et l'échelle de variation naturelle de la biomasse et de la production du bactérioplancton et du phytoplancton.

A cet effet, les variations temporelles des biomasses et des activités bactérienne et phytoplanctonique ont été étudiées à différentes échelles de temps allant de l'heure à la saison. Plusieurs cycles journaliers, réalisés à des stations de conditions trophiques contrastées montrent qu'en conditions météorologiques stables, les variables mesurées montrent des variations qui bien que de faible amplitude sont structurées sur 24 h. La biomasse phytoplanctonique estimée au moyen de la chlorophylle *a* augmente de jour (6h-18h) et diminue de nuit. La production bactérienne obéit à la même tendance avec un léger décalage. En parallèle, les concentrations en nutriments montrent un maximum en fin de nuit et un minimum. Ces résultats indiquent que l'extrapolation d'une mesure ponctuelle à une valeur journalière peut se faire avec une approximation raisonnable hors période d'instabilité météorologique. Ces tendances sont par contre très sévèrement affectées par le régime des vents.

Les variations saisonnières des variables planctoniques et nutritives ont été étudiées selon une fréquence hebdomadaire à bi-mensuelle en deux stations de degrés trophiques contrastés. Ce suivi permet de mettre en évidence une importante variabilité à court terme (entre prélèvements)

[6] Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication, prochainement soumise dans Coral Reefs

des variables biologiques, du même ordre que l'amplitude saisonnière. Ces variations sont vraisemblablement dues au renouvellement des eaux lagonaires par les eaux océaniques sous l'influence du vent. La biomasse phytoplanctonique, et les productions primaire et bactérienne montrent des maxima en Décembre-Janvier et en Avril-Mai et un minimum pendant l'hiver austral (Août). Les concentrations et rapports entre nutriments suggèrent que l'azote minéral dissous est le premier élément limitant la croissance phytoplanctonique.

Aux 2 stations étudiées sur une base annuelle, la production primaire particulaire planctonique ne semble pas suffisante pour supporter la demande bactérienne en carbone.

III.2. INTRODUCTION

Characterized by the oligotrophic nature of its waters, the southwest (SW) lagoon of New Caledonia receives increasing nutrient loads due to the urbanization and increasing metal inputs due to mining activities. Indeed, nutrient enrichments in the urban area lead to significantly modified phytoplankton assemblages (Jacquet et al. *in revision*) and nickel and associated metal concentrations are several orders of magnitude greater in the bays receiving mining refuse than in other parts of the lagoon (Moreton *pers com*). Since a significant part of metal contamination of tentative bio-indicators occurs through planktonic foodwebs, especially through phytoplankton (Hédouin et al. *in prep*), assessing the effects of these growing anthropogenic impacts requires appreciating the importance and the natural variations of biomass and activity of organisms located at the base of planktonic foodwebs; *i.e.* phytoplankton and bacterioplankton.

Benthic primary production and respiration display similar seasonal variations with higher values during the warm season (November to February), when maximum irradiance and particulate organic carbon supply occur (Clavier & Guarrigue 1999). Conversely, very little is known about temporal variations of planktonic processes in the SW lagoon of New Caledonia. To our knowledge, only an index of phytoplankton biomass (Chl.*a*) and mesozooplankton biovolumes were determined weekly and monthly respectively for several years in a limited number of stations (Binet & Leborgne 1996). Both display important between-sample variations, in the range of seasonal variations, and significant interannual differences. Bujan et al. (2000), Douillet et al. (2001), and Pinazo et al. (2004) showed the importance of wind forcing on the renewal of lagoon water by oligotrophic oceanic waters. Indeed, Bujan et al. (2000) estimated

that the residence time of water, and therefore the biomass of phytoplankton, was closely linked to the direction and intensity of wind in the SW lagoon of New Caledonia.

The aim of this study was to assess temporal variations of bacterioplankton and phytoplankton biomass and production at different scales ranging from hours to seasons. For this purpose, we studied diurnal variations of planktonic processes at different stations. Day-to-day variations were evaluated during one week in a station under anthropogenic and terrestrial influence. Finally, seasonal variations were examined by sampling weekly to bimonthly two stations of contrasted trophic status.

More precisely, we addressed the following questions: What is the range of diurnal variations of phytoplankton biomass, bacterioplankton biomass and activity and related variables like nutrients? What daily representativity can we expect from discrete measurements? What is the range of variation of planktonic processes at short-term (week level) and over the year? Are seasonal variations similar in the oligotrophic area of the lagoon and in areas under anthropogenic impact? On an annual basis, what is the ratio of bacterioplankton carbon demand to phytoplankton production?

Understanding the functioning of microbial foodwebs requires determining the principal factor limiting the plankton growth. N is generally considered as the principal limiting factor in tropical coastal waters (Howarth 1988) but this may vary widely among different areas (Smith 1984, Dufour et al. 1999, Sala et al. 2002) and possibly over seasons. A final aim of this study was to assess seasonal variations of nutrient and elemental ratios, in order to determine the limiting factor and its variations throughout the year.

Table III.1 - Overview of studies at different temporal scales in the SW lagoon of New Caledonia.
BP: Bacterial Production; BA: Bacterial Abundance; PP: Primary Production; Chl.*a*: Chlorophyll *a* concentration; nutrients: Ammonium, Nitrate + Nitrite, Phosphate, Dissolved Organic Nitrogen, Dissolved Organic Phosphate and Silicates; CTD variables: temperature, salinity, turbidity, *in vivo* fluorescence.

Temporal scale	Date	Station	Measured variables	Sampling Depth (m)	Sampling frequency
Diel	23/09/00 to 24/09/00	A24	BP, BA, Chl.*a*, nutrients, CTD variables	3	Each hour from 9:00 am to 9:00 am
Diel	11/04/02 to 13/04/02	M33 N12	BP, Chl.*a*, nutrients, CTD variables	5	1st day : Every 4 hours from 6:00 am 2nd day : Every 6 hours
Diel	26/06/03 to 27/06/03	M33	BP, Chl.*a*, nutrients, CTD variables	3	Every 2 hours from 6:00 am to 6:00 am
Day-to-day	11/02/04 to 17/02/04	N12	BP, Chl.*a*, CTD variables	3	Every day at 07:30 am and 04:30 pm
Seasonal	04/04/02 to 04/04/03	M33 N12	BP, PP (total, >2 µm, >10 µm), BA, Chl.*a* (total, >2 µm, >10 µm), nutrients, CTD variables, wind, irradiance	integrated	Weekly from April to May & December to January Bi-monthly the other months
Seasonal	04/04/03 to 04/04/04	M33 N12	Chl.*a*, nutrients, CTD variables	3	Weekly for CTD Bimonthly for nutrients and Chl.*a*

III.3. MATERIAL AND METHODS

III.3.1. STUDY SITE AND SAMPLING.

The SW lagoon of New Caledonia has been well described elsewhere (Jacquet et al. *in revision*). Temporal variations of planktonic processes were studied at scales ranging from hours to season (Table III.1).

Diel variations were studied at stations M33 (Z = 24 m, 22°21'23''- 166° 23'43'') and A24 (Z = 30m, 22°34'03'' – 166°41'34''), remote from coastal areas and from bays naturally or artificially enriched (Figure III.1). The choice of these sites, situated in spatially homogeneous environments, was intended to minimize variations of plankton biomass and activity due to water mass movements induced by tides or rivers flows. For comparison, diel variations were also studied at eutrophic station N12 (Z = 14 m, 22°17'40" – 166°27'44", Figure III.1) situated in Sainte-Marie Bay receiving urban sewages.

Day-to-day variations were examined at station N12. Water samples for diel and day-to-day variations studies were collected at 3 m depth, using acid-washed Niskin bottles and treated within 1 hour at the IRD laboratory (except for diel studies of September 2000 and June 2003 which were conducted on board the Alis research vessel where samples were treated immediately).

Seasonal variations were determined at station M33 (24m deep), representative of the Southern Shelf (Jacquet et al. *in revision*) and at station N12 (14m deep), as an example of a site under anthropogenic influence. Samples were collected from 4/4/02 to 4/4/03 every week or every other week at 5 depths homogeneously distributed over the whole water column (3, 7.2, 11.5, 15.8, 20 m for M33, 3, 4.7, 6.5, 8.2, 10 m for N12). Samples were kept in Niskin bottles until being pooled at the laboratory within 1h30 after sample collection. Sampling was continued with fewer variables (Table III.1) between 04/04/03 and 04/04/04.

III.3.2. WATER COLUMN PHYSICAL DESCRIPTION.

Temperature, *in vivo* fluorescence, salinity, turbidity and Photosynthetic Active Radiations (PAR) profiles were recorded along the whole water columns using a SeaBird SBE 19 profiler with Seapoint Fluorometer and Turbidity Meter. I*n vivo* fluorescence was converted into Chlorophyll *a* concentration (µg l^{-1}) using the linear relationship ($n = 123$, $p < 0.001$) computed with Chlorophyll *a* retained onto GF/F filters (cf. § III.3.5)

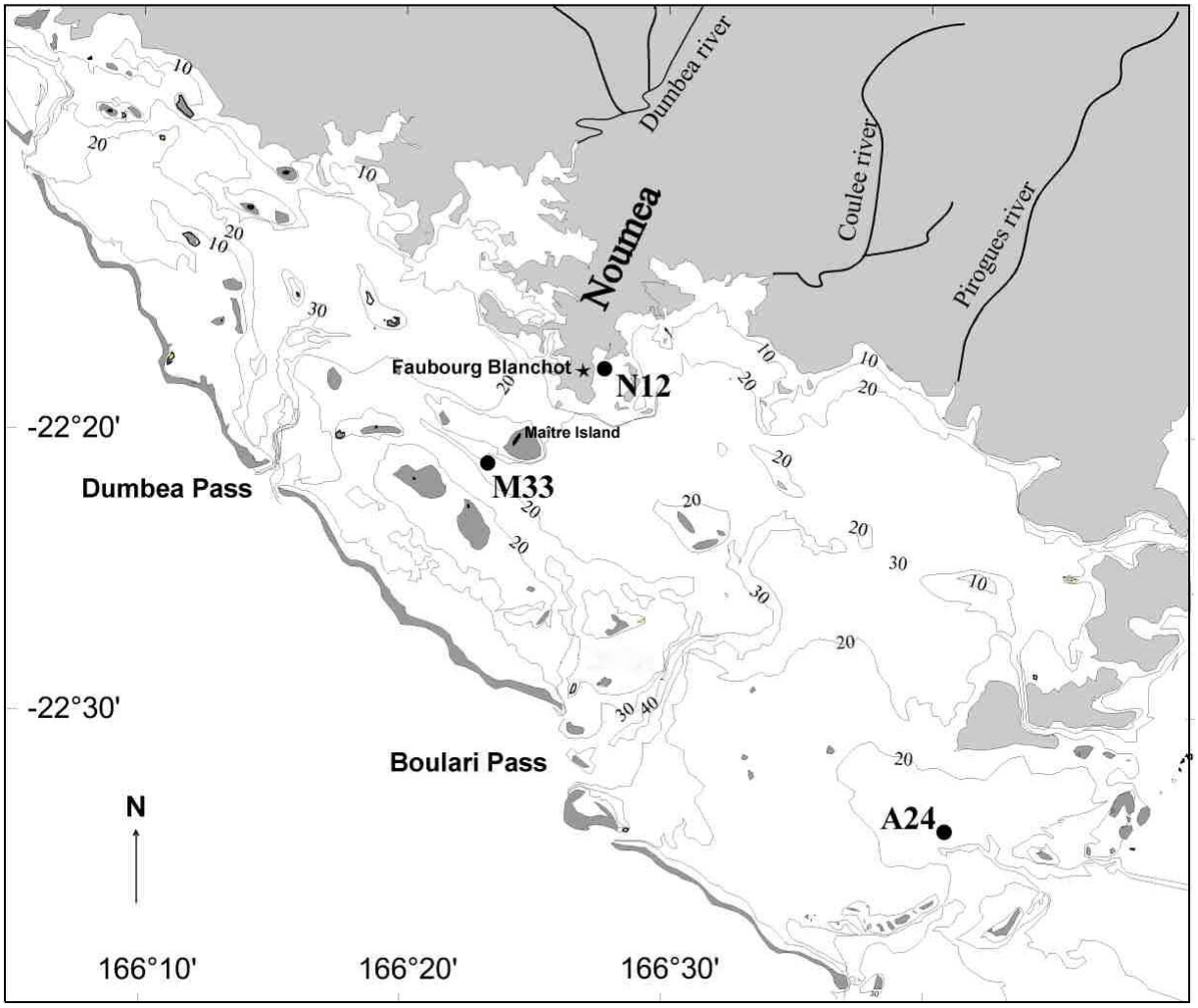


Figure III.1 - Stations positions. Faubourg Blanchot is the site of the Météo France meteorological centre. Maître Island is the site where wind is recorded continuously

III.3.3. METEOROLOGICAL VARIABLES.

Wind was continuously recorded at the Maître Island station (Figure III.1) situated in the Western Shelf. Occasionally missing data were calculated from Météo France data (Faubourg Blanchot station, in Nouméa, Figure III.1) and using the highly significant relationship between Maître Island and Faubourg Blanchot wind data ($n = 416$, $p < 0.001$).

Incident Photosynthetic Active Radiations were recorded continuously near primary production incubations.

III.3.4. BACTERIAL BIOMASS AND PRODUCTION

Heterotrophic bacteria were enumerated by flow cytometry after SYBR green coloration (Marie et al. 1997). Water samples (1.5 ml) were preserved with 7.5 µl glutaraldehyde (Sigma Grade II) at room temperature in the dark for 15 min before storage in liquid nitrogen pending analysis. Enumeration was conducted on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488nm and with a standard filter setup. Yellow fluoresbrite 0.95 µm beads were used as internal standards (size and fluorescence). The count rates per second never exceeded 500 optical events in order to avoid underestimation of particle abundance.

Bacterial production was estimated using [*methyl*-^{3}H]thymidine (TdR) incorporation into DNA (Fuhrman & Azam 1982). Duplicate 10-ml (M33) seawater samples were incubated at *in situ* temperature (± 1°C) with 15 nM TdR (Final concentration, Amersham France, 2.9 TBq mmol^{-1}). After 60 min of incubation, incorporation was stopped by addition of buffered formalin (2% final concentration). Samples were then filtered onto 0.2-µm Nuclepore polycarbonate membranes. The vacuum was disconnected and filters received 15 ml ice-cold 5% TCA. After 15 min to allow TCA precipitation, vacuum was reapplied and the membranes were rinsed 3 times with 5 ml of ice-cold 5 % TCA. Filters were then placed in scintillation vials, hydrolyzed 30 min with 0.5 N HCl and received 4 ml scintillation cocktail after cooling. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting and quench correction was made with external standards. Incorporation was calculated after subtracting a time zero blank. TdR incorporation was converted into bacterial production using conversion factor empirically determined in the SW lagoon (avg.±SE 2.85 ± 0.4 10^{18}cell mol^{-1}, n=7) and 12.8 fgC cell^{-1} (Fukuda et al 1998).

III.3.5. PHYTOPLANKTONIC ABUNDANCE AND PRODUCTION

Chlorophyll *a* (Chl.*a*) concentration was fluorometrically determined on 7 ml methanol extracts of replicate 300 ml samples collected on Whatman GF/F filters according to Holm-Hansen et al. (1965). When determined, the size fractionated Chl.*a* concentrations were estimated on replicate 300 or 500 ml samples, using 2 µm and 10 µm porosity Nuclepore membranes.

Primary production was estimated using ^{14}C-bicarbonate (Steeman-Nielsen, 1951) in "simulated *in situ*" conditions. Water was distributed into seven 76ml-Nalgene Polycarbonate bottles. Five sub-samples used to measure total phytoplanktonic incorporation were incubated with 0.15 MBq of ^{14}C-bicarbonate (Amersham, 60-68 MBq ml^{-1}), and 2 sub-samples used to measure ^{14}C-incorporation in >2 and >10 µm fractions were incubated with 0.30 MBq of ^{14}C-bicarbonate. The 5 total phytoplanktonic sub-samples were placed under shading nets re-creating different percentages of irradiance, in a thermoregulated (*in situ* temperature ± 2°C) container exposed to the daylight. The 2 bottles used for >2 and >10 µm production were incubated similarly but at one light level corresponding to 68 % incident irradiance in order to avoid photoinhibition. Incubations lasted about 4 hours, generally between 9 a.m. and 1 p.m. Introduced radioactivity was then measured by placing 50 µl of several random samples in polyethylene scintillation vials with 4 ml of scintillation cocktail solution (Packard, Ultima Gold®) and 50 µl of Carbosorb® (Packard). Samples were then immediately filtered onto Whatman GF/F, 2-µm or 10-µm porosity Nuclepore polycarbonate membranes under low depression (< 7000 Pa). Membranes were then placed in scintillation vials, received 250 µl of 0.5 N HCl and were placed under the hood overnight to remove carbonates. Samples were counted in a Tri-Carb scintillation counter after the addition of 4 ml of scintillation cocktail (Packard, Ultima Gold®). Counting efficiency was determined using external standards. The amount of carbon fixed per day (PP in mgC m^{-3} d^{-1}) was computed using the formula PP = $(dpm_1/dpm_2)(V_p/V_t)$ A 1.05 (E_d/E_i), where dpm_1 is the radioactivity incorporated in each sample, dpm_2 is the total introduced radioactivity, Vp is the volume of sample taken for determination of total radioactivity, V_t the volume of sample, A is the concentration of carbonates in the SW lagoon (average 28215 mgC m^{-3}), 1.05 is the isotopic fractionation between ^{12}C and ^{14}C, E_d and E_i are irradiances received daily and during the incubation in E m^{-2} d^{-1}.

III.3.6. NUTRIENTS

Ammonium concentration was fluorometrically determined on three 40 ml replicates on a Turner TD-700, using the *o*-phtaldialdehyde method (Holmes et al. 1999). This procedure gave a coefficient of variation (CV%) between replicates ranging from 5 (eutrophic) to 30% (oligotrophic waters).

Unfiltered replicate 40 ml samples were immediately frozen pending nitrate + nitrite (NO_3 + NO_2), and phosphate (PO_4) analyses. Nitrates (NO_3) were reduced to nitrites (NO_2) according to Wood et al. (1967), and NO_3 + NO_2 concentrations were determined according to Raimbault et al. (1990) on a Bran+Luebbe Autoanalyzer III with an average CV of 3 (eutrophic) to 8% (oligotrophic) between replicates. Phosphate concentrations were determined according to Grasshoff et al. (1983) on a Bran+Luebbe Autoanalyzer III with an average CV of 6 to 11% between replicates. Silicates were determined on one 60 ml subsample which was immediately frozen after sampling. Total silicates (dissolved and colloidal) were measured following the Koroleff (1983)'s protocol.

Total nitrogen (TN) and phosphorous (TP) were determined from unfiltered replicate 120 ml samples immediately frozen until analysis. After mineralization of organic material by wet oxidation (Raimbault et al. 1999), phosphates and nitrates were measured as described above. Dissolved organic nitrogen (DON) and phosphorous (DOP) were computed by subtracting corresponding dissolved inorganic and particulate organic nutrients from TN or TP.

Table III.2 - Summary of diel studies in the SW lagoon.
BP: Bacterial Production (pM h^{-1}); BA: bacterial abundance (10^6 cell ml^{-1}); Chl.*a*: Chlorophyll *a* (µg l^{-1}); NH_4: ammonium (µM); NO_3+NO_2: nitrates + nitrites (µM); PO_4: Phosphates (µM); DIN:PO_4 = (NH_4+NO_3+NO_2)/ PO_4; DON: Dissolved Organic Nitrogen (µM); DOP: Dissolved Organic Phosphate (µM) and Si: Silicates (µM). CV%: coefficient of variation; Max/min: maximum to minimum ratio and Day/Night: ratio between daily and nightly averages.

Date	Stations		BP	BA	Chl.*a*	NH_4	NO_3+NO_2	PO_4	DIN:PO_4	DON	DOP	Si
Sept 23, 2000	A24	Mean	1.58	0.49	0.15			0.04		6.31	0.25	1.1
		CV%	8	12	10			35		10	18	26
		Max/min	1.6	1.6	1.4			2.9		1.7	2.2	2.7
		Day/Night	0.9	1.1	1.1			1.4		1.0	1.0	0.9
April 11, 2002	M33 - day 1 -	Mean	0.92		0.23	0.01	0.01	0.05	0.3	4.83	0.20	3.1
		CV%	59		43	30	50	12	22	13	26	6
		Max/min	5.9		4.6	2.6	6.2	1.4	2.0	1.4	1.9	1.3
		Day/Night	0.4		0.7	0.8	1.1	1.2	0.8	0.9	0.9	0.9
April 12, 2002	M33 - day 2 -	Mean	1.66		0.42	0.01	0.00	0.04	0.35	5.37	0.19	2.8
		CV%	16	ANALYZES IN PROGRESS	25	24	61	10	25	8	3	8
		Max/min	1.5		2.3	1.8	5.7	1.3	1.9	1.2	1.1	1.3
		Day/Night	0.8		1.1	1.3	0.3	1.0	1.0	1.2	0.9	1.0
April 11, 2002	N12 – day 1 -	Mean	4.36		0.77	0.02	0.07	0.13	0.71	6.65	0.31	4.3
		CV%	63		31	52	72	26	50	12	14	10
		Max/min	7.6		3.3	3.8	10.5	2.3	4.1	1.5	1.5	1.5
		Day/Night	0.6		0.7	0.5	0.2	0.6	0.4	0.8	0.8	0.9
April 12, 2002	N12 – day 2 -	Mean	8.77		0.81	0.01	0.04	0.15	0.34	6.62	0.35	4.0
		CV%	7		16	38	79	7	64	18	8	10
		Max/min	1.2		1.6	3.1	10.1	1.2	5.8	1.7	1.3	1.3
		Day/Night	1.0		0.8	0.6	0.2	1.0	0.3	1.4	1.1	1.1
June 26, 2003	M33	Mean	5.98		0.26	0.02	0.02	0.03	1.43	4.37	0.20	1.7
		CV%	21		16	85	34	22	22	4	8	23
		Max/min	2.6		1.7	13.4	2.64	2.13	2.0	1.1	1.3	2.2
		Day/Night	0.9		1.1	0.3	0.7	0.8	0.8	1.0	0.9	1.0

III.4. RESULTS

III.4.1. DIEL CYCLES

III.4.1.1. Biological parameters

For most (4 out of 6) of the diel cycles (Table III.2), biological parameters did not show important variability with coefficient of variation always less than 25%. Daily and nightly averages did not differ significantly for BA, BP and Chl.*a*. However, diel trends of Chl.*a* concentration were consistently observed over 24h (Figure III.2A). Indeed, during stable meteorological conditions, Chl.*a* increases slightly during daylight hours and then decreases during night time. Bacterial production follows the pattern of Chl.*a* with a time lag of some hours (Figure III.2B).

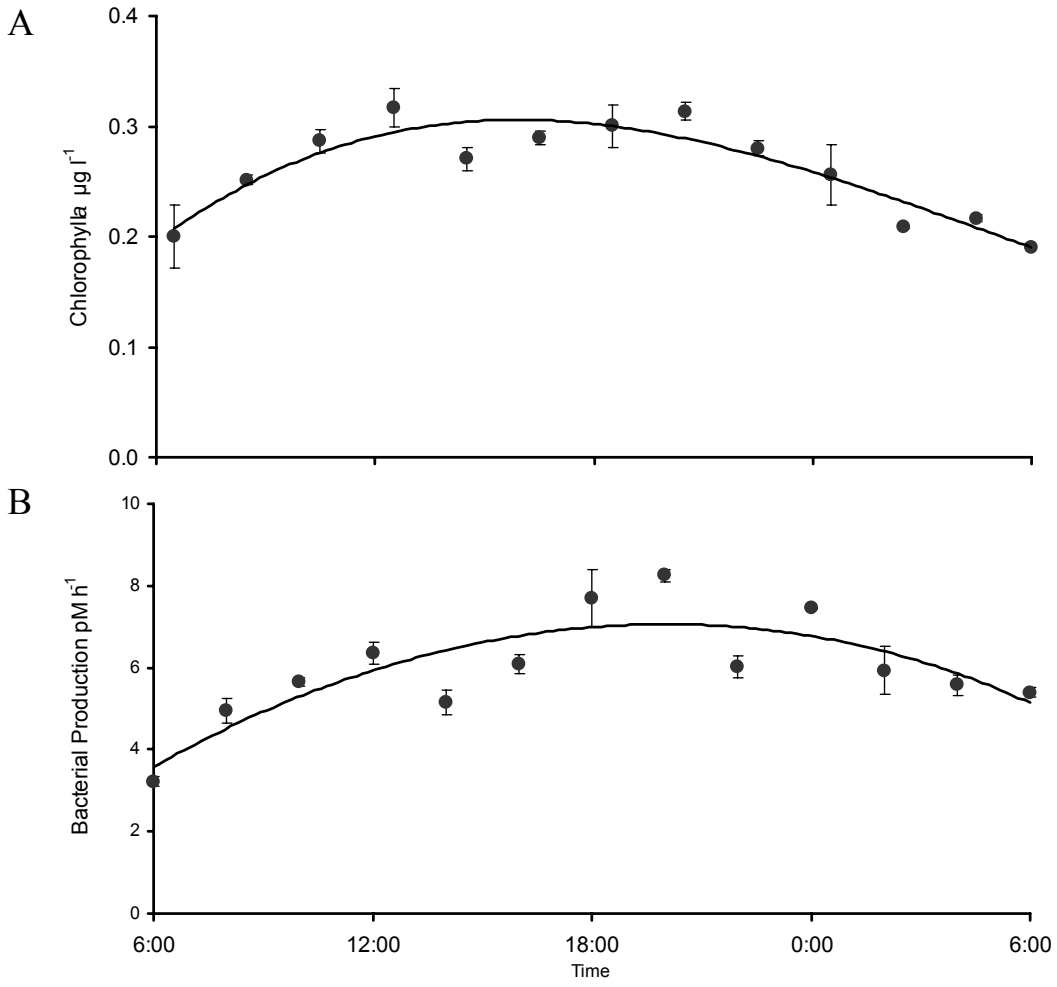


Figure III.2 - (A) Chl.*a* concentration and (B) Bacterial production during a diel cycle at station M33, June 2003. Black lines represent polynomial fits. Bars are SE

Diel cycles realized on 11 April 03 showed a much larger diel variability. Wind conditions were not constant with maximum velocity between 6:00 and 12:00 am (wind speed increased from 8 to 12 m s^{-1} which corresponds to increase in wind stress from 64 to 144 m^2 s^{-2}), associated to an increase of biological variables (Figure III.3). Return to more quiet conditions the day after was associated to much lower temporal variations (Table III.2, Figure III.3). During the second day, there was indeed no significant difference between night and day averages for BP, BA and Chl.*a* like during the 4 other diel cycles.

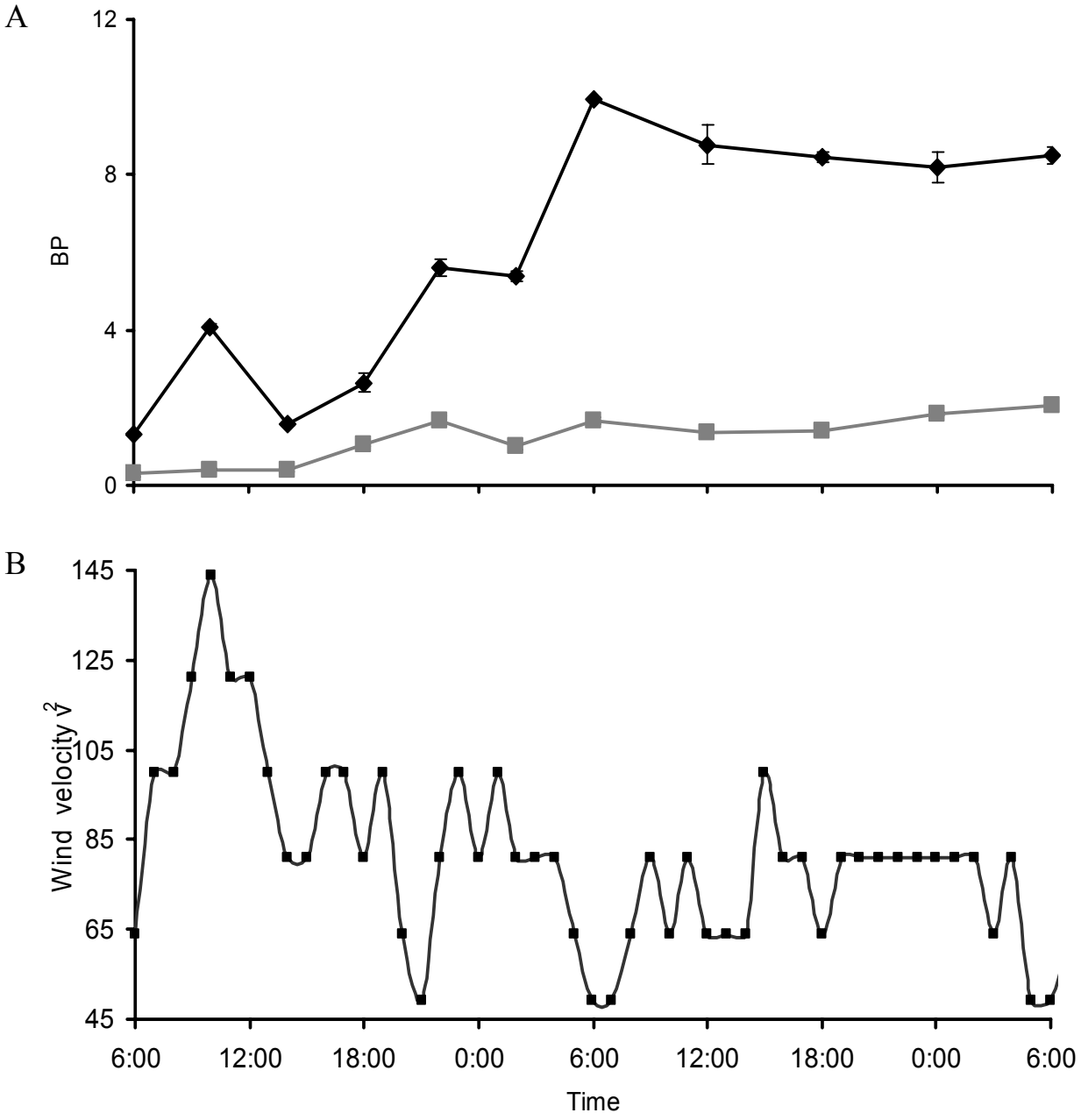


Figure III.3 - (A) Bacterial production (BP pM h^{-1}) measured in M33 (□) and N12 (◊) between April 11 and April 13, 2002. (B) Wind stress: (wind velocity)^2 in m^2 s^{-2} measured at "Faubourg Blanchot" Météo France station.

III.4.1.2. Nutrients

In stable meteorological conditions, nutrient concentrations showed significant trends over diel cycles (Table III.2, Figure III.4). Typically, NH_4 and NO_3+NO_2 concentrations decreased during the day and increased during the night. PO_4 followed the same pattern, with concentrations higher during the night than during daylight hours.

DON and DOP concentrations varied little over the diel cycles with a mean CV% of 11 ± 1% for DON and 13 ± 1% for DOP. Average CV for silicates over all diel cycles was 14 ± 1 %

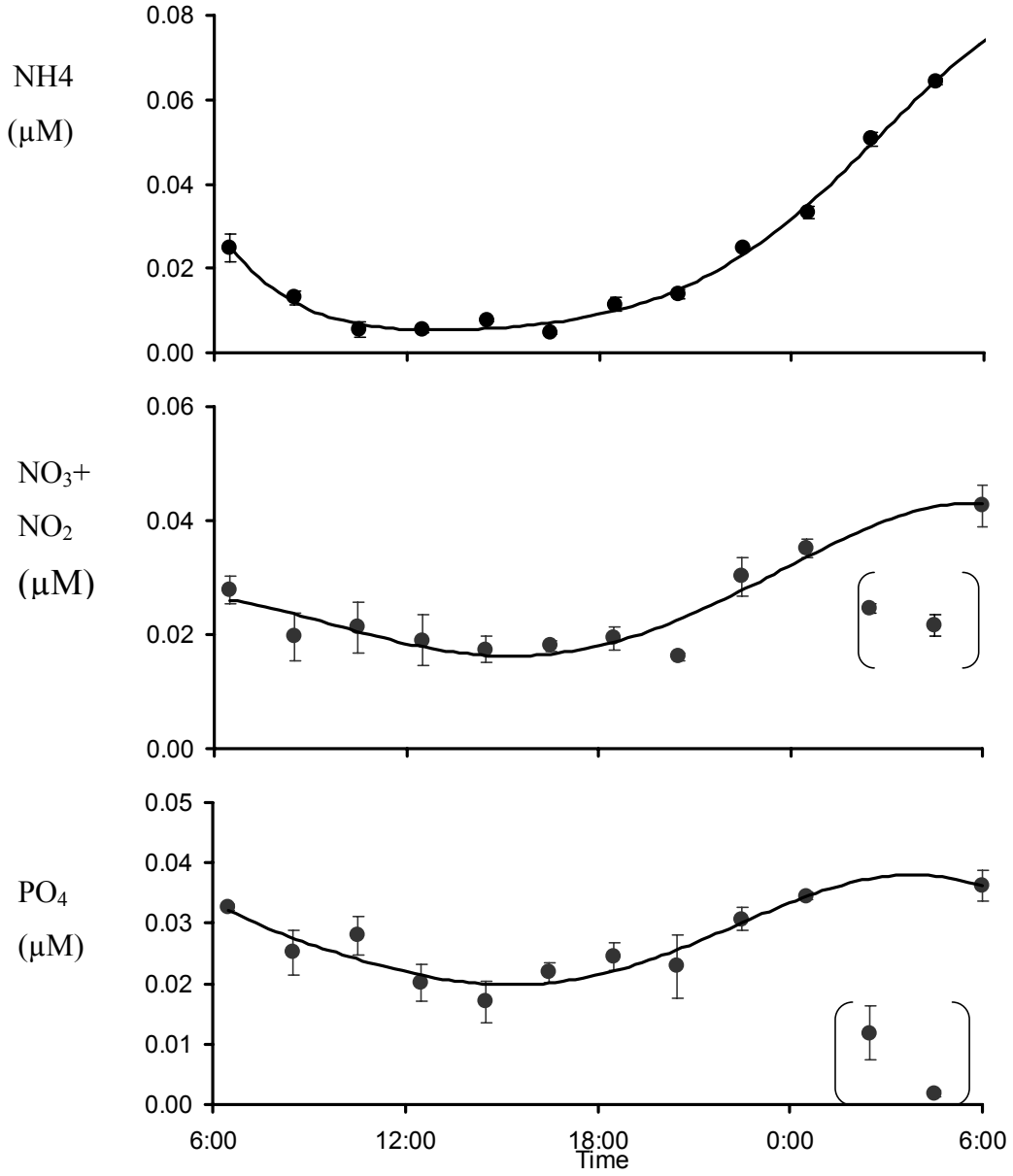


Figure III.4 - NH_4, NO_3+NO_2 and PO_4 concentrations during a diel cycle at station M33, June 2003. Bars represent SE between replicate determinations (often less important than the symbol size). Black lines represent polynomial fits. Points between brackets were excluded from the regression.

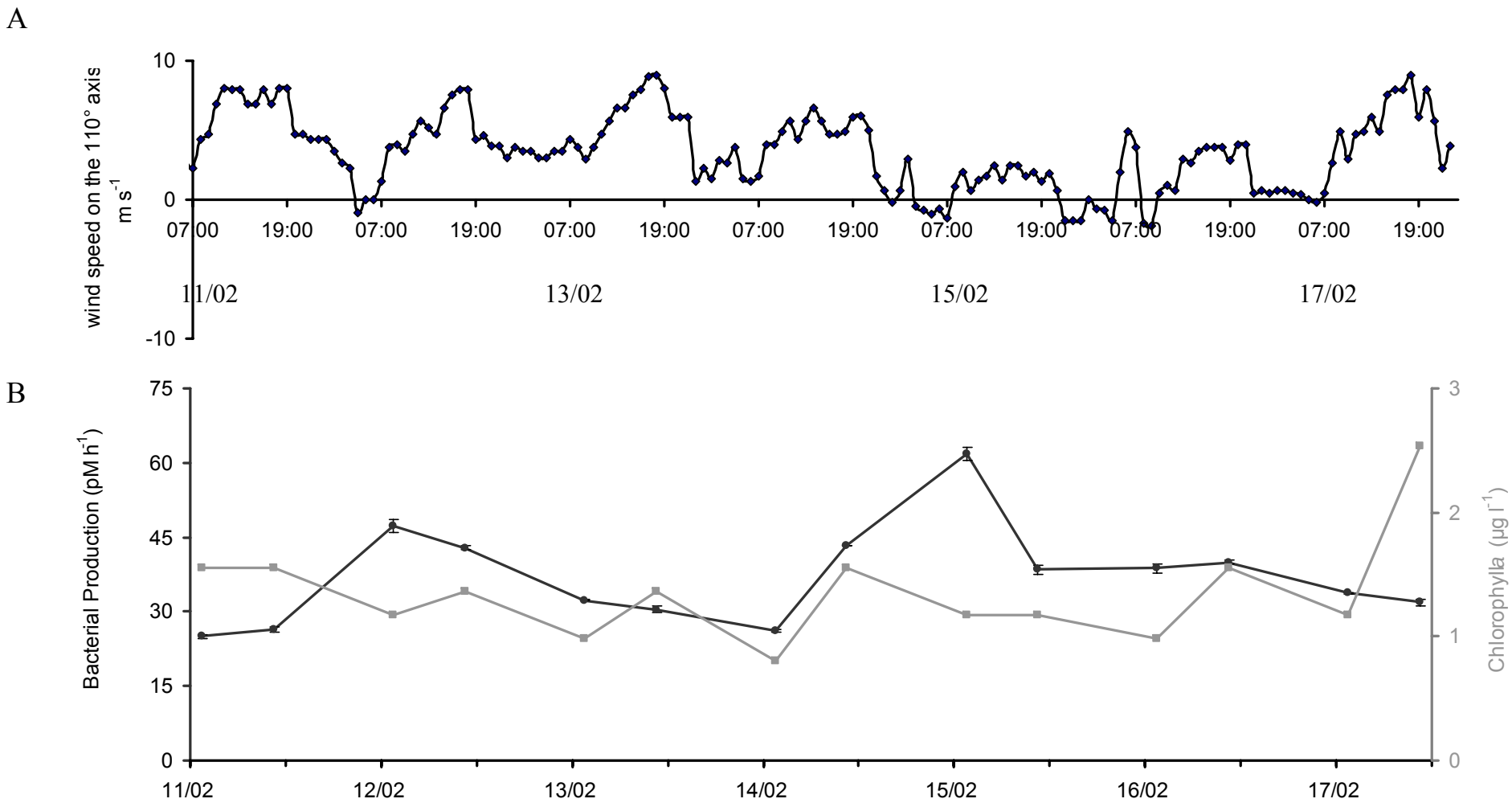


Figure III.5 - (A) Wind speed projected on the 110° axis between 11/02/04 and 17/02/04. Positive and negative values represent South-Eastern and Western winds, respectively. (B) Day-to-day variations of bacterial production and Chl.*a* at 3 m depth at station N12. Bars represent SE (often less important than the symbol size). Measures were made at 7:30 am and 4:30 pm daily between 11/02/04 and 17/02/04.

III.4.2. DAY-TO-DAY VARIATIONS

During this week, precipitation was scarce with only 9.8 mm d^{-1} (in 5 hours) on 16/02/04. Daily irradiance was on average (± SE) 51 (± 4) E m^{-2} d^{-1}, except the 16/02/04 with 29 E m^{-2} d^{-1}. Wind speed varied as a function of the day, with increasing speed during the day and decreases during the nights (Figure III.5A). Southeast Trade Winds prevailed between 11/02/04 and 15/02/04; and the speed did not exceed 10 m s^{-1}. Wind speed decreased between 15/02/04 and 17/02/04, and wind direction orientated west, between the end of the 15/02/04 and the beginning of the 16/02/04. Temperature, salinity and turbidity on the whole water column were constant with average values of 29.7 ± 0.1°C, 35.8 ± 0.0 and 1.7 ± 0.1 FTU, respectively (not shown).

Bacterial production (BP) and Chl.*a* were recorded twice a day at 7:00 am and 4:30 pm at station N12 (3 m depth), from February 11 to 17, 2004 (Figure III.5B). Morning and afternoon values were not significantly different for BP (average afternoon:morning ratio ±SE = 1.02 ± 0.11), whereas afternoon values were slightly higher for Chl.*a* (afternoon:morning ratio=1.40 ± 0.14). BP and Chl.*a* varied respectively by 1.32 ± 0.09-fold and 1.11 ± 0.05-fold ratio between successive days.

III.4.3. SEASONAL VARIATIONS

III.4.3.1. Meteorological conditions

Winds, recorded between April 2002 and April 2003 (Figure III.6A and III.6B), are characterized by two main directions: South-Eastern trade winds blowing from 90° to 160° represent 68 % of yearly wind occurrence. Westerly winds blowing from 220° and 300° represent 11 % of yearly wind occurrence. Two periods may be distinguished: May to October with these two directions alternating, and October to February characterized mostly by South-East Trade Winds. Wind speed ranged between 0.13 and 13 m s^{-1} with an exceptional average daily intensity of 41 m s^{-1} on 14 March 2003 corresponding to cyclone Erika. Wind speed varied on average (± SE) by 2.0 ± 0.1 fold between successive days, with a maximal ratio of 15. **Irradiance** (Figure III.6C) showed important day-to-day variations, and varied seasonally with minimal values in June - July (5-25 E m^{-2} d^{-1}) and maximal values in December – January (10-62 E m^{-2} d^{-1}). Day-to-day variations were on average 1.42 fold. Yearly averaged PAR received daily was 38.6 ± 0.7 E m^{-2} d^{-1}.

Precipitation (Figure III.6D) are characterized by a strong variability between months. Precipitation ranged between 0 and 57.6 mm d^{-1}, with a period without precipitation between October 02 and December 02, and a period with high precipitations from December 02 to April 03.

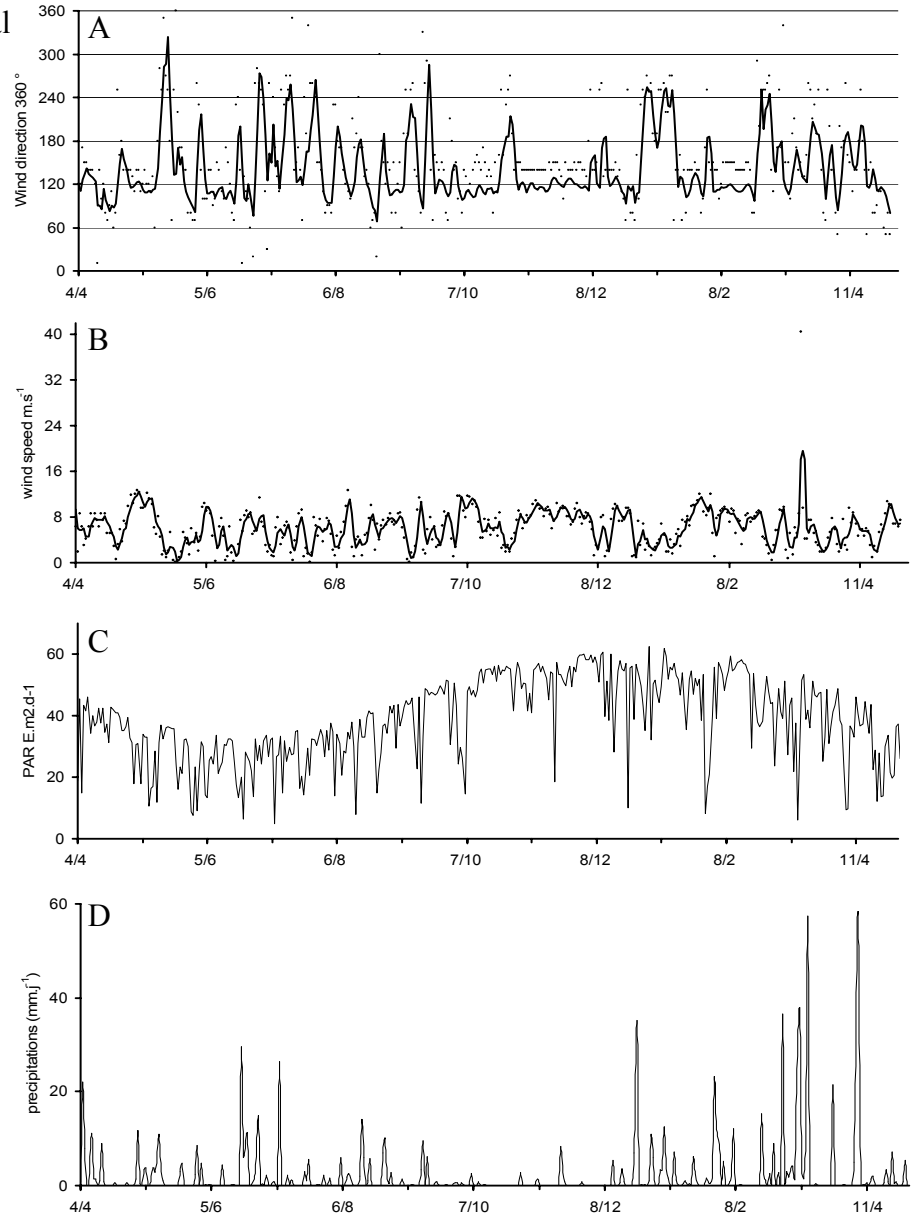


Figure III.6 - Meteorological variables between April 02 and April 03. Wind was recorded at Maître I. station and precipitation was recorded at Meteo France station.

III.4.3.2. Hydrological description

Water Column Homogeneity

Hydrological parameters were measured using a CTD probe at stations M33 and N12 simultaneously with water sample collection from 04/04/02 to 04/04/03 and were continued until the end of March 04. In order to assess average vertical distribution of variables acquired with the probe, variables were first averaged every 0.5 m along the water column. Next, data were expressed as difference to water column average (for temperature) or percentage of water

column average (for salinity, Chl.*a* and turbidity). Finally, differences and percentages were averaged for the 107 and 102 profiles realized respectively at stations M33 and N12 (Figure III.7).

The water column at station M33 is on average homogeneous. Indeed, differences between sub-surface (0.5 m) and bottom samples are weak, with average differences of 0.2 °C, 0.06 psu, 0.16 FTU and 0.017 µg Chl.*a* l^{-1}. A slight turbidity increase in bottom (18-24 m) samples reveals the nepheloid layer, and Chl.*a* increases on average by 11 % from the top to the bottom of the water column (excluding 24-m deep samples, often larger due to sediment resuspension).

The water column at station N12, shallower than M33, displays similar but more pronounced vertical trends. Average differences between sub-surface (0.5 m) and bottom samples are 0.25 °C, 0.5 psu, 2.2 FTU and 0.11 µg Chl.*a* l^{-1}. Chl.*a* and turbidity increase more sharply than at M33 within the nepheloid layer, two meters above the bottom.

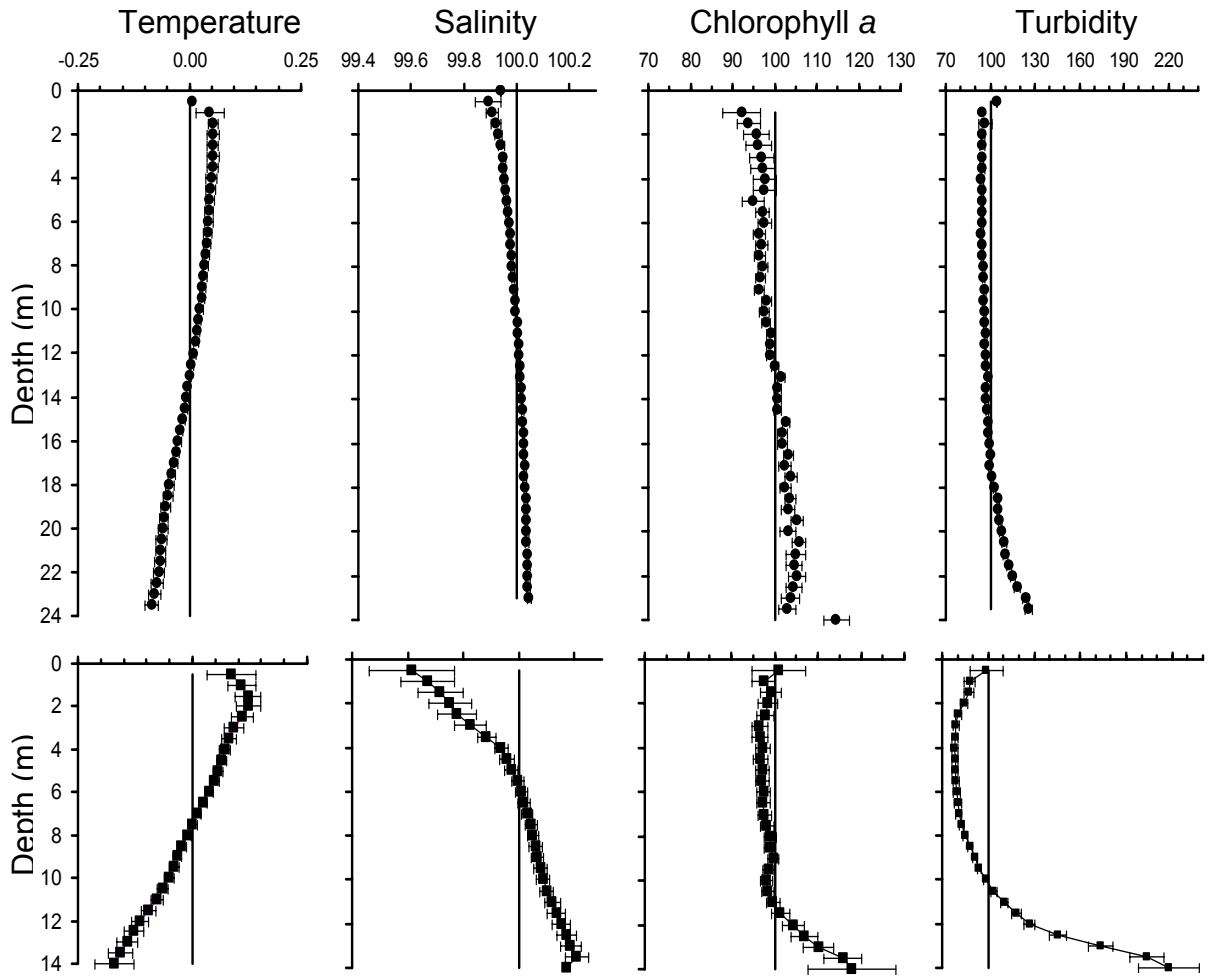


Figure III.7 - Average vertical distribution of normalized CTD variables at stations M33 (top, n=107) and N12 (bottom, n=102). Temperature (°C) is expressed as the difference to water column average. Salinity, chlorophyll *a in vivo* fluorescence, and turbidity are expressed as a percentage of water column average. Error bars are SE.

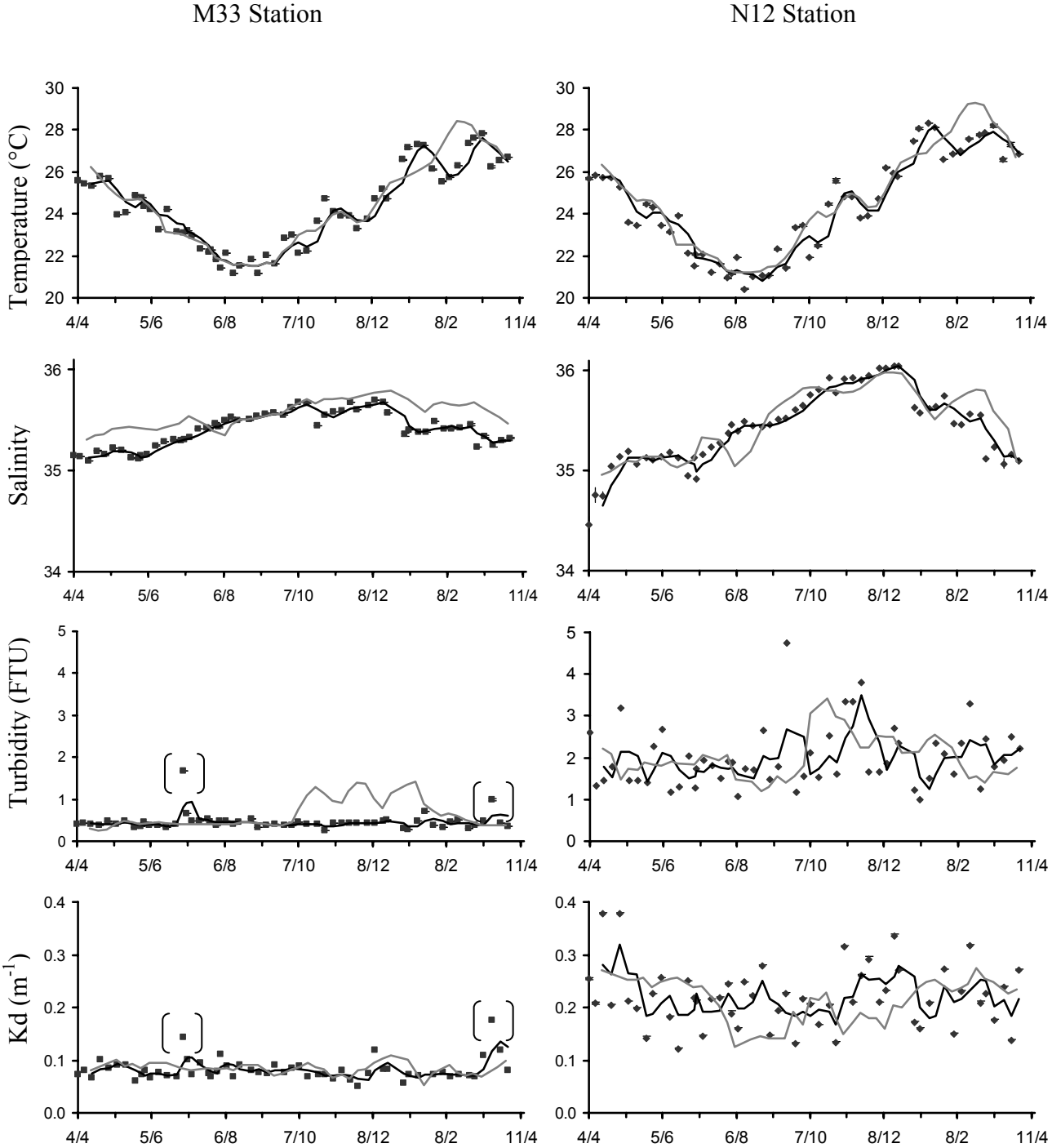


Figure III.8 - Temperature, salinity, turbidity, and Kd at stations M33 and N12. Points represent measures recorded between April 2002 and April 2003. Bars represent SE (often less important than the symbol size). Black lines are corresponding 3-period moving averages (outlier values between parentheses are not included). Grey lines represent 3-period moving averages between April 2003 and April 2004 (data points are not figured).

Description of hydrological variables between 2002 and 2003

Minimum temperature (21.2 and 20.4 °C at M33 and N12, respectively) occurred in August and maximal values were attained in February (27.8 and 28.3°C at M33 and N12, respectively, Figure III.8).

Salinity varied little throughout the year. Like for temperature data, the seasonal trend was more pronounced at N12 (range 35.1 - 36.1) situated in a bay, than at M33 in the Western Shelf. (range 34.5 - 35.7).

Turbidity and Kd, the vertical attenuation coefficient for PAR, varied slightly at M33 with a CV% of 17 %, excluding 2 outlier values (Figure III.8). Average (±SE) turbidity and Kd were 0.43 ± 0.01 FTU and 0.08 ± 0.00 m^{-1}, respectively. Turbidity and Kd varied more largely at station N12, with CV% of 37 and 26 %, respectively. Average (± SE) turbidity and Kd were higher than at station M33 with 1.96 ± 0.10 FTU and 0.22 ± 0.01 m^{-1}, respectively. Except for a turbidity maximum in November to January, none of these variables did display any seasonal trend.

Comparison between 2002-2003 and 2003-2004

The seasonal trends of hydrological variables were relatively similar between 2002-2003 and 2003-2004 (Figure III.8). Summer 2003 temperatures slightly exceeded those from summer 2002 by 0.8°C and 1.2°C, at M33 and N12, respectively. Salinity was generally higher at M33 in 2003-2004 than the year before and turbidity showed higher values between October and February during the second year.

III.4.3.3. Nutrients

III.4.3.3.1. Mineral

Mineral nutrients (DIN, PO_4, Si) did not show clear seasonal trends at station M33 (Figure III.9). At station M33, **DIN,** comprising on average 67 ± 3 % of NH_4, presented a 5-fold maximum (0.79 µM, for a yearly average of 0.15 ± 0.02 µM) between June and August 2002 and minor fluctuations during the remainder of the year. In N12, DIN comprising on average 56 ± 3 % of NH_4, showed 3 to 5-fold relative maxima in April-May 2002 (2 µM), between June and August 2002 (1.6 µM) and April-May (2.61 µM) again in 2003 compared to the yearly average (0.56 ± 0.10 µM).

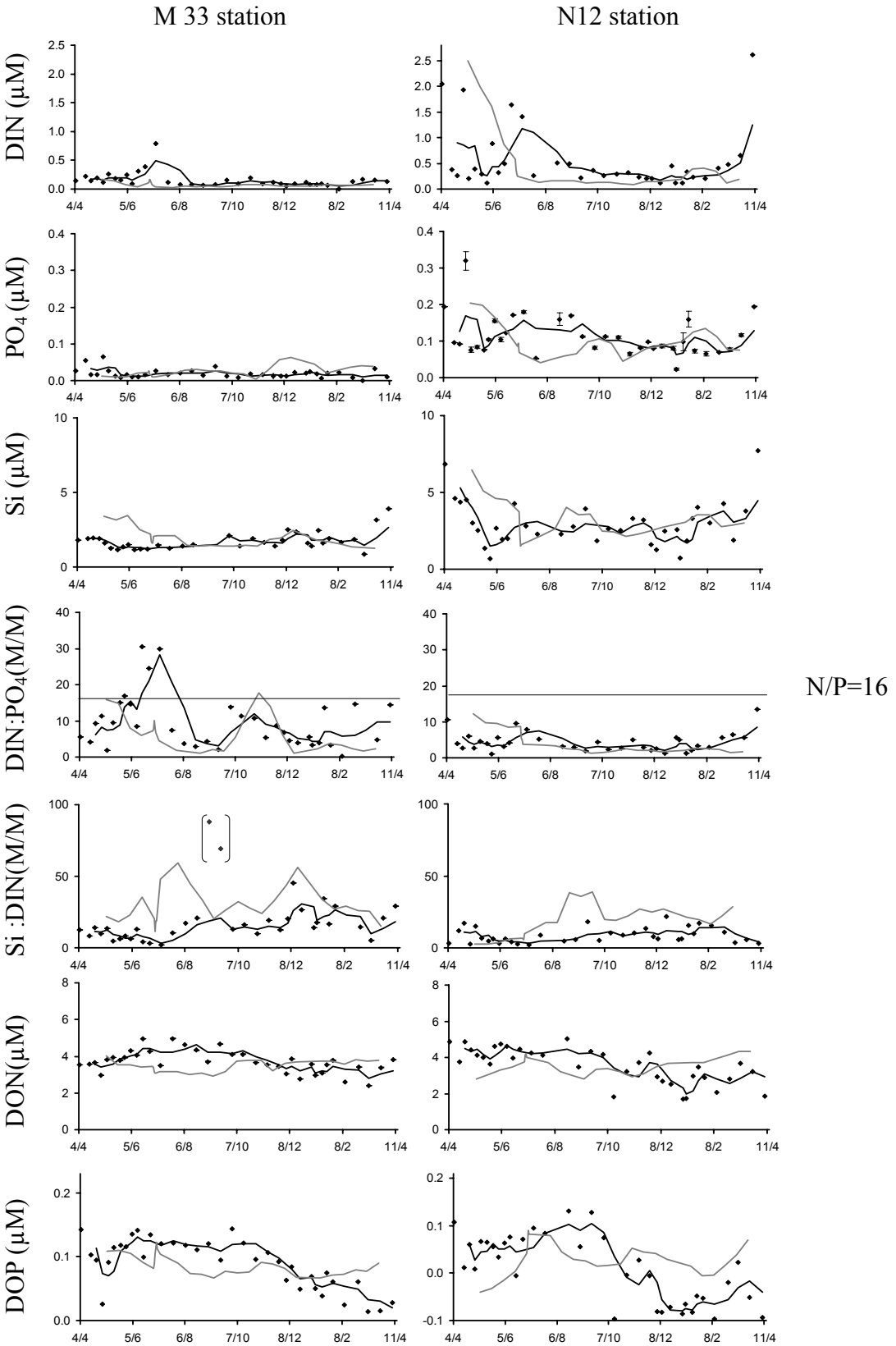


Figure III.9 - Nutrient concentrations at stations M33 and N12. See Table III.2 for legends. Points represent measures recorded between April 2002 and April 2003. Bars represent SE (often less important than the symbol size). Black lines represent corresponding 3-period moving averages (outlier values between parentheses are not included). Grey lines represent 3-period moving averages between April 2003 and April 2004 (data points are not figured). Negatives POD values are discussed in the text.

PO_4 varied little around the yearly averages of 0.02 ± 0.00 µM at station M33 and 0.11 ± 0.01 µM at station N12. Maximum values were 0.06 µM (May 02) at M33 and 0.32 µM (April 02) at N12.

Silicate concentrations averaged (± SE) 1.74 ± 0.10 µM at M33 and 3.00 ± 0.25 µM at N12. Concentrations were relatively constant throughout the year at M33. At N12, concentrations decreased from April (6.85 µM) to May (0.70 µM), were then relatively stable and increased again from January (0.72 µM) to April (7.74 µM). As expected because they are brought by river runoffs, silicates behaved at the opposite of salinity (Figure III.9).

Mineral nutrient concentrations were higher throughout the year at station N12 than at M33. Variability between successive samplings was generally more important at M33 than at N12 (Table III.3). A part of these differences could be due to the error of the measures which were often near detection limits due to the oligotrophy of M33.

III.4.3.3.2. Elemental ratios

The DIN:PO_4 ratio was on average (± SE) higher at M33 (9.44 ± 1.24) than at N12 (4.4 ± 0.5). At both stations these ratios are lower than Redfield ratio most of the year (N:P min = 16:1, Redfield et al. 1963). At station M33, four sampling dates display ratios above 16:1, but they correspond to minimal PO_4 values around the detection limit and could be due to uncertainty in PO_4 values (Figure III.9). These low PO_4 values probably explain a part of the high variability between successive sampling dates at M33 (4.2-fold on average), compared to N12 (2.0-fold, Table III.3).

The Si:DIN ratio was also quite constant throughout the 2002-2003 year. This ratio was always higher than the Redfield value of 1:1 and averaged (± SE) 45 ± 2 at M33 and 21 ± 1 at N12.

III.4.3.3.3. Organic

DON did not vary considerably and data only show a weak seasonal trend with a relative maximum from June to November 02 (4.3 ± 0.1 µM) compared to the remaining of the year (3.4 ± 0.1 µM) at M33 (Figure III.9). This trend was different the following year. DON concentrations at N12 were maximal between April 02 and November 02 (4.1 ± 0.2 µM) compared to the remaining of the year (2.8 ± 0.2 µM). Yearly averaged concentrations were similar at the two stations with 3.6 ± 0.2 µM at N12 and 3.7 ± 0.1 µM at M33.

DOP concentrations were low, ranging from the detection limit to 0.11 µM at M33 and to 0.12 µM at N12. Negative DOP values from December to March at N12 (Figure III.9) are, of course, due to methodological limits. Since they are computed by subtracting POP and PO_4 values from TOP, TOP was likely underestimated. This underestimation is likely due to incomplete wet oxidation of TOP before PO_4 analysis. Indeed, if we compare PON obtain from CHN analyses with PON determined using wet oxidation, the latter is on average underestimated by c.a. 20% (data not shown). Assuming that TOP is underestimated by the same amount, the real values would be 20% larger and minimum DOP values would be near zero between December and March at N12.

Both stations displayed higher concentrations from May to November (0.09 ± 0.01 at M33 and 0.05 ± 0.01 µM at N12) and then decreased near the detection limit.

Comparison between 2002-2003 and 2003-2004

Like for hydrological conditions, nutrient concentrations showed a seasonal pattern in 2003-2004 roughly similar to that observed in 2002-2003 (Figure III.9). Only Si:DIN ratio showed generally higher values throughout the year, whereas DON showed variation at the opposite of those observed the preceding year.

Table III.3 - Variations of turbidity, Kd, nutrient concentrations, Chl.*a*, PP and BP between successive samplings from April 2002 to April 2003. Variations are ratios between successive maximal and minimal values. Min, max: minimal and maximal variations between successive samplings. Max range: maximum difference between minimal and maximal values recorded during the sampling year. For frequency of samplings see Table III.1.

	M33				**N12**			
	Avg±SE	Min	Max	Max range	Avg±SE	Min	Max	Max range
Turbidity	1.2±0.0	1.0	1.9	0.5 FTU	1.4±0.1	1.0	2.6	2.7 FTU
Kd	1.2±0.0	1.0	1.6	0.1 m^{-1}	1.4±0.1	1.0	2.4	0.3 m^{-1}
DIN	2.7±0.7	1.1	22.9	0.8 µM	2.7±0.4	1.0	9.5	2.5 µM
PO_4	3.2±1.1	1.0	39.6	0.1 µM	1.7±0.2	1.0	4.3	0.3 µM
Si	1.3±0.1	1.0	3.8	3.1 µM	1.7±0.1	1.0	3.9	7.0 µM
NOD	1.2±0.0	1.0	1.5	2.6 µM	1.3±0.1	1.0	2.3	3.3 µM
POD	1.6±0.2	1.0	5.0	0.11 µM	6.1±3.0	1.0	39.3	0.1 µM
DIN:PO_4	4.2±1.7	1.0	57.9	30.2 M:M	2.0±0.2	1.1	5.1	12.3 M:M
Si:DIN	1.9±0.2	1.0	5.7	43.5 M:M	2.3±0.3	1.1	7.3	19.5 M:M
Chl.a	1.3±0.0	1.0	2.0	0.3 µg.l^{-1}	1.5±0.1	1.0	2.6	1.9µg.l^{-1}
PP	2.0±0.0	1.0	5.5	24 mgC $m^{-3}d^{-1}$	1.6±0.0	1.0	3.0	104 mgC $m^{-3}d^{-1}$
BP	4.0±0.2	1.0	34.5	8.4 mgC $m^{-3}d^{-1}$	1.6±0.0	1.0	2.7	45 mgC $m^{-3}d^{-1}$

III.4.3.4. Seasonal variations of biological parameters

Bacterial abundance

Les données sont en attente du fait de problèmes techniques sur le cytomètre de flux

Phytoplankton biomass

At station M33, total Chl.*a* concentration showed two periods of relative maxima, one between April and June 2002 (0.27 ± 0.01 µg l^{-1}) and the other one in January (0.25 ± 0.02 µg l^{-1}) compared to the remaining of the year (0.21 ± 0.01 µg l^{-1}, Figure III.10A and III.10B). Maximum values of April-June 2003 (0.39 ± 0.03 µg l^{-1}) were far more important than in 2002.

The seasonal pattern was similar but more pronounced in N12 (April-June: 1.33 ± 0.17 µg l^{-1}, December-January: 1.34 ± 0.14 µg l^{-1}, remaining of the year : 0.78 ± 0.03).

Yearly average (± SE) Chl.*a* concentration was significantly ($n = 60$, $p < 0.001$) higher in N12 (0.97 ± 0.05 µg l^{-1}) than in M33 (0.25 ± 0.01 µg l^{-1}). Average (± SE) variation between successive samplings were similar at N12 (1.5 ± 0.1 fold) and M33 (1.3 ± 0.0 fold) (Table III.3).

Size-fractionated Chl.*a* concentrations were measured only between April 2002 and April 2003 (Figure III.10B). The distribution of Chl.*a* in size classes was different between each station. M33 is characterized by a <2 µm fraction that is dominant throughout the year (average ± SE= 71 ± 1 %) and 2-10 µm and >10 µm fractions contributing by 12 ± 1 % and 16 ± 1 % on average to total Chl.*a*. At station N12, <2 µm (41 ± 2 %) and >10 µm (43 ± 2 %) fractions contributed in similar proportions to total Chl.*a*, whereas 2-10 µm fraction was on average 17 ± 2 %. Percent distribution in Chl.*a* did not show any clear seasonal trend in M33 and N12 (Figure III.10B).

Bacterial and primary production.

Primary (PP) and bacterial (BP) production displayed similar seasonal trends at each station (Figure III.11).

At station M33, primary production showed two periods of maxima between April and May 2002 (7.1 ± 0.9 mgC m^{-3} d^{-1}), and between December and January (12.2 ± 3.4 mgC m^{-3} d^{-1}) compared to the remainder of the year (5.6 ± 0.6 mgC m^{-3} d^{-1}). Maximum values of March-April 2003 (16.7 ± 2.0 mgC m^{-3} d^{-1}) were more important than in 2002. PP averaged yearly 8.1 ± 0.3 mgC m^{-3} d^{-1} at M33.

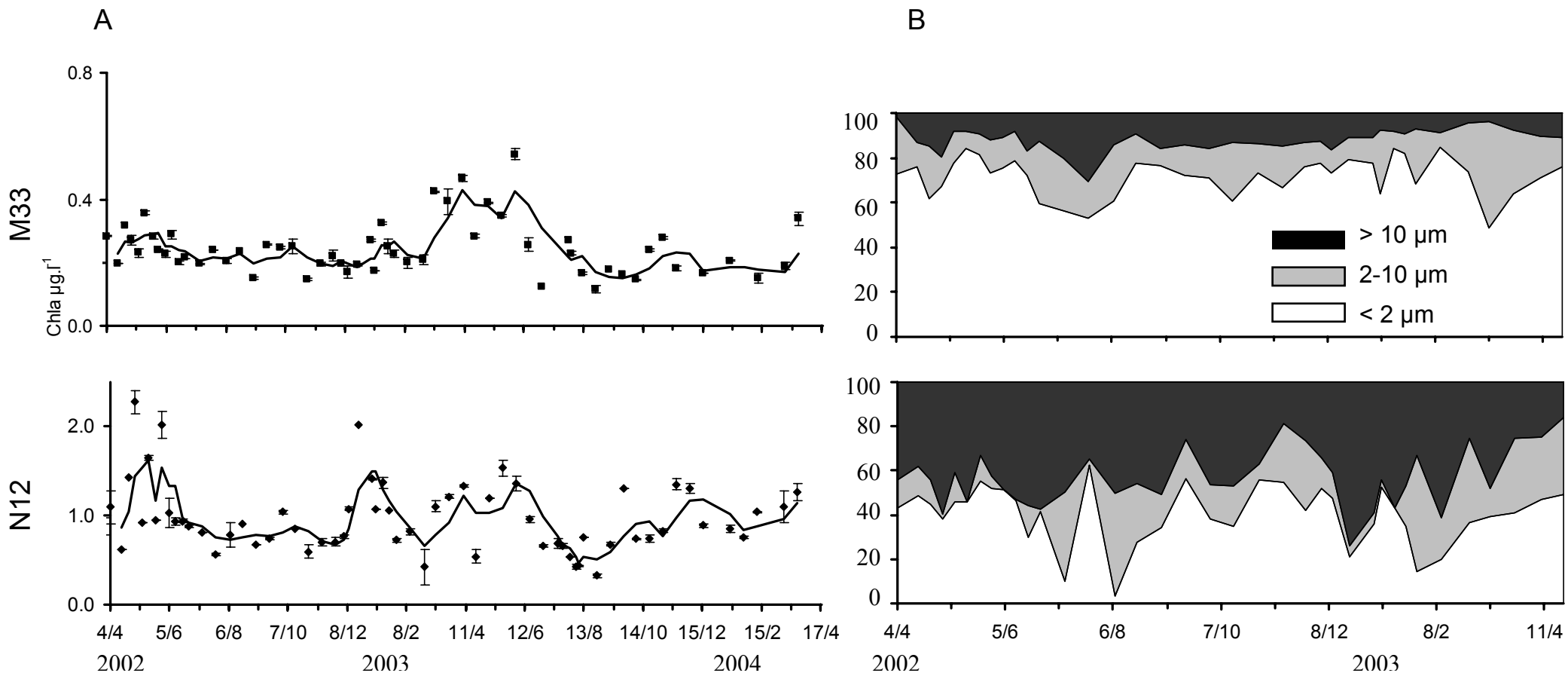


Figure III.10 – (A) Total chlorophyll *a* concentrations at stations M33 and N12 between April 2002 and April 2004. Lines represent 3-period moving averages. Bars represent SE. (B) Percent contribution of different size classes to total Chl.*a* at stations M33 and N12.

BP averaged (± SE) 1.7 ± 0.3 mgC m^{-3} d^{-1} for the whole year, with highest values between January and February (4.4 ± 1.2 mgC m^{-3} d^{-1}) compared to the remaining of the year (1.1 ± 0.1 mgC m^{-3} d^{-1}).

At station N12, maximal values of primary production were observed in April-May 2002 (71.4 ± 2.1 mgC m^{-3} d^{-1}), December-January (67.5 ± 8.0 mgC m^{-3} d^{-1}) and again in March-April 2003 (81.9 ± 15.9 mgC m^{-3} d^{-1}). Yearly average PP was 45.3 ± 4.1 mgC m^{-3} d^{-1}. Bacterial production was on average 16.6 ± 1.8 mgC m^{-3} d^{-1} for the year, with highest values in December-January (34.0 ± 2.2 mgC m^{-3} d^{-1}) and March 2003 (33.9 ± 6.3 mgC m^{-3} d^{-1}) compared to the remaining of the year (11.2 ± 0.8 mgC m^{-3} d^{-1}).

Both BP and PP were significantly (Student's t-test, $p < 0.001$) higher throughout the year in N12 than in M33. Variation (max:min ratio) between successive samplings was on average higher in M33 than in N12 (Table III.3).

Contribution of each size classes (>2 and >10 µm) to total PP was computed from total PP retained onto GF/F membranes at the same irradiance level (Figure III.11B). Like for size-fractionated Chl.*a*, the <2 µm size class contributed in majority (81 ± 2 %) to total PP throughout the year at M33 with minor contributions for the 2-10 µm (11±1 %) and > 10 µm (8 ± 1 %) fractions. Mean contributions of each fraction to total PP, at N12, were quite similar for <2 µm (39 ± 3%), 2-10 µm (28 ± 3%) and >10 µm (32 ± 2 %).

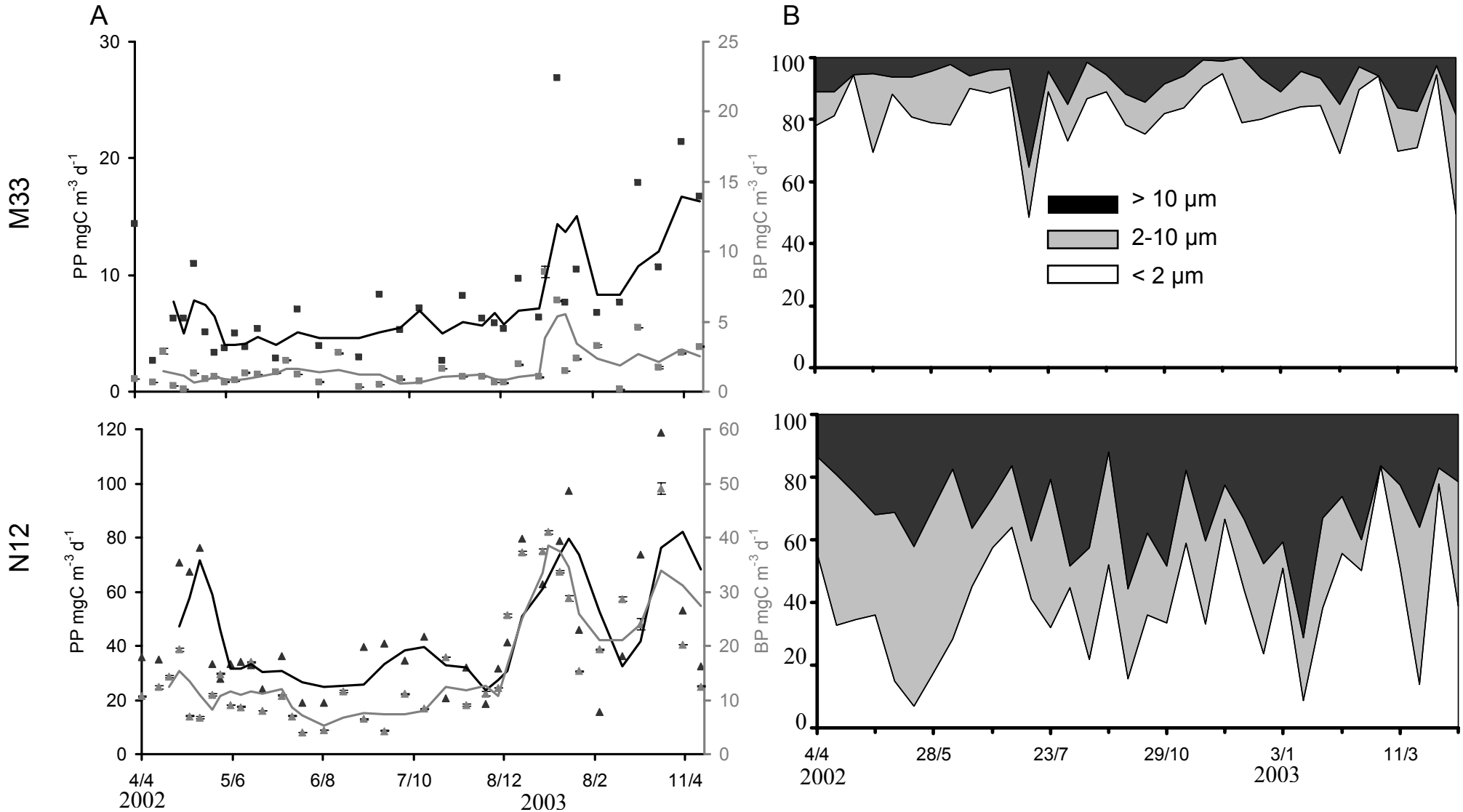


Figure III.11 – (A) Primary (PP, black symbols) and bacterial (BP, grey symbols) productions at stations M33 and N12 between April 2002 and April 2003. Lines represent 3-period moving averages. Bars represent SE. (B) Percent contribution of each size-class to total PP at M33 and N12.

III.5. DISCUSSION

III.5.1. DAILY AND SHORT TERM REPRESENTATIVITY OF MEASUREMENTS

Daily variations. We studied the variations of phytoplankton and bacterioplankton biomass and activity over diel cycles in order to verify the daily representativity of discrete measures. Of the six diel cycles realized, four presented weak fluctuations of planktonic biomasses and bacterial activity, with CV values less than 25 %. Even with these modest variations, Chl.*a* and nutrient concentrations showed a consistent diel pattern during stable meteorological conditions (Figure III.2, III.4). At a given depth, variations in pigment concentrations are the result of various factors including: 1) the balance between phytoplankton growth and mortality, 2) cellular physiological adaptations to environmental modifications (e.g., photoacclimatation), and 3) the effects of external physical factors such as vertical mixing, advection and sinking.

The slight increase during daylight hours and the subsequent decrease of Chl.*a* (Figure III.2) can probably be partially explained by a night time maximum grazing by vertically migrating mesozooplankton or even diel variations of grazing by protists (Christaki et al. 2002, Neveux et al. 2003). Conversely, nutrient concentrations decreasing during daylight can be explained by phytoplankton uptake whereas night time nutrient increases can be the result of night time zooplankton grazing and excretion.

Determining the origin of these diel variations is however beyond the scope of this study. The atypical diel cycle of the 11th April 2002, presenting more important fluctuations of biological values is likely related to the effects of external physical factors. Wind forcing increased strongly during the first 12 hours and then decreased the second 12 h before remaining nearly constant the next 24 h (Figure III.3). Wind is an important physical factor influencing the circulation of water and particles in the SW lagoon of New Caledonia (Douillet et al. 2001). Vertical mixing due to strong winds likely induced sediment resuspension (confirmed by correspondingly increasing turbidity, data not shown) and therefore could have enriched the water column with phytoplankton contained in the nepheloid layer. Nutrient enrichment in the water column due to vertical mixing could also have resulted in increases of bacterial activities and phytoplankton biomass.

These cycles were intended to verify if a discrete measurement, always realized at the same hour, may be extrapolated at the day level. Our results indicate that when meteorological

conditions remain stable, biological processes do not show strong daily variations and that phytoplankton biomass and bacterioplankton biomass and activity determined from a single sampling can be considered representative of the daily value within 20 %.

Day-to-day variations. Day-to-day variations of Chl.*a* were moderate during one week at eutrophic station N12. The 1.1-fold average difference between successive days may be in part explained by winds. Indeed, in this data set Chl.*a* is positively correlated to trade wind stress (i.e. square wind speed projected on the 110° axis, $r = 0.58$, $p<0.05$). Moreover, this influence of wind, presenting a daily maximum in the afternoon, could partly explain the 1.4-fold higher Chl.*a* concentrations in the afternoon on average.

Maximum amplitude during this week was about 2.5-fold for BP and 1.9-fold for Chl.*a* concentration. These results show the importance of short term variability of these biological variables, which is due in part to short term wind variations strongly affecting phytoplankton biomass and, likely, bacterial production.

III.5.2. SEASONAL VARIATIONS

III.5.2.1. 2002-2003 representativity and seasonal variations

El Nino events are characterized by a 20-50 % decrease of rainfall in New Caledonia (Nicet & Delcroix 2000) and an increase of evaporation due to stronger winds (Ouillon et al. *submitted*). This results in higher salinity values in the lagoon during such events. Since 2002-2003 was considered as a moderate El Niňo event (McPhaden 2004), hydrological variables and Chl.*a* concentration were monitored in 2003-2004 for comparison. Our results indicate that most physical and biological variables were roughly comparable to those recorded in 2002-2003. Most of the differences were due to variations in amplitude. Furthermore, our seasonal description of phytoplankton biomass is similar to that described in a 1979-1989 weekly survey showing relative maxima of Chl.*a* in April-May and December-January (Binet & LeBorgne 1996). We can therefore consider our description of seasonal dynamics of planktonic activities and biomass as representative of the average seasonality in the lagoon.

This long term survey showed that seasonal variations of phytoplankton biomass in the lagoon are low with a factor of 2.3 between minimal and maximal values, compared to short-term variability, showing on average 1.7-fold variation between successive weeks. Our results showed the same pattern. Indeed, at station M33, representative of average lagoon conditions, phytoplankton biomass varied on average by about 1.3-fold (the maximum variation being 2.0-fold) between successive samplings (1-2 weeks) whereas seasonal variation of Chl.*a* were in the

same range. Indeed, the relative maxima in April-June 2002 and December-January are only 1.3-fold and 1.2-fold above the remainder of the year. This is also true for bacterial and primary production where maximal seasonal variations (respectively 3 and 4.4-fold) are relatively close to the average short-term variation (Table III.3). The importance of the short-term variability compared to seasonal variations is similar at station N12.

Seasonal trends are weak in tropical marine systems away from upwelling areas due to weak meteorological variations over the year (Cushing 1959). The importance of short-term variations compared to seasonal trends is likely a characteristic of tropical shallow coastal systems where temperature, irradiance and stratification vary little throughout the year (Figure III.6 and III.7) and when physical forcing can strongly affect short term variations in the water column.

III.5.2.2. Homogeneity of water column

CTD profiles during this 2 year-survey showed that, on average, the water column is nearly homogeneous in the lagoon channel (M33, n=107) and, in a lesser degree, in the eutrophic bay site (N12, n=102). Since three meter deep samples were collected for diurnal or day-to-day studies, we compared 3 m-deep *in vivo* fluorescence (average from 2.5 to 3.5 m) to water column averages as a proxy for phytoplankton biomass. The ratio between 3 m deep and water column average is not significantly different from 1 at both stations. This ratio ranged between 0.8 and 1.2 in 77 % of M33 profiles and 73 % of N12 profiles. This indicates that 3 mdeep sampling, chosen to avoid reduced salinity water following high precipitation, is well representative of the whole water column on average.

The larger nepheloid at station N12 than at M33 could be due to both depth and sediment type differences. Indeed, at station N12 the muddy sediment is likely to be more easily resuspended by vertical mixing due to wind influence than at the deeper station M33 where sediment is composed of coarse sand.

III.5.2.3. Trophic status of the two sites throughout the year

We chose M33 (lagoon channel) and N12 (Sainte-Marie Bay) stations in order to evaluate the range of seasonal variations of planktonic activities and biomasses in two contrasted environments. Mineral nutrient concentrations, phytoplankton and bacterial biomass and production were indeed significantly higher at station N12 than at station M33.

Table III.4 - Seasonal variation of the primary limiting factor for phytoplankton. Limiting factor is determined for phytoplankton using *in situ* nutrient concentrations following Justic et al. (1995) (cf. text). N: DIN is the limiting factor, P: PO_4 is the limiting factor, - : none of N, P or Si limits the phytoplankton growth.

	M33	N12
4/4/02	N	-
16/4/02	N	N
23/4/02	N	N
30/4/02	-	-
7/5/02	N	N
14/5/02	N	N
22/5/02	-	N
28/5/02	-	N
4/6/02	-	N
11/6/02	N	N
18/6/02	P	N
26/6/02	P	-
9/7/02	P	-
23/7/02	N	N
7/8/02	N	
20/8/02	N	N
3/9/02	N	N
17/9/02	N	N
1/10/02	-	N
14/10/02	-	N
29/10/02	-	N
12/11/02	N	N
25/11/02	N	N
4/12/02	N	N
10/12/02	N	N
20/12/02	N	N
3/1/03	N	N
7/1/03	N	N
15/1/03	N	N
21/1/03	-	N
28/1/03	N	N
11/2/03	N	N
27/2/03	-	N
11/3/03	P	N
25/3/03	N	N
9/4/03	-	-

Correspondingly, phytoplankton size structure is dominated by larger cells at station N12 than at station M33 (Figure III.10). These two stations showed the same pattern of seasonal variations, but they were more pronounced at the eutrophic station N12. This similarity of pattern between the two stations was also observed for DON and DOP concentrations.

III.5.2.4. Limiting factor

Deviations from Redfield ratios are considered as an index of the potentially limiting factor (Dortch & Whitledge 1992). In a further study, Justic et al. (1995) suggested that stoichiometric limitation be determined according the following criteria: (1) P limitation, if $Si:PO_4 > 22$ and $DIN:PO_4 > 22$, (2) N limitation, if $DIN:PO_4 < 10$ and $Si:DIN > 1$, (3) Si limitation, if $Si:PO_4 < 10$ and $Si:DIN < 1$. The stoichiometric ratio is an indication of suggested limitation; and probable limitation is assessed if the nutrient concentration is under a threshold limiting nutrient uptake. Justic et al. (1995) estimated threshold values of 2, 1 and 0.1 µM for Si, DIN, and PO_4 respectively.

A simultaneous mineral nutrient limitation of bacteria and phytoplankton can be hypothetized in oligotrophic marine environments (Thingstad et al. 1998) and bacteria are presumed to be able to outcompete larger cells like phytoplankton for limiting nutrients (Bratbak & Thingstad 1985). Inorganic nutrient availability may therefore also directly limit heterotrophic bacterial activity (Caron 1994, Kirchman 1994).

It is important to keep in mind that considerable uncertainty remains on elemental ratios for both phytoplankton (Saňudo-Wilhelmy et al. 2004) and bacterioplankton (Kirchman 2000). As an example, while C:N ratios were long considered lower for bacterioplankton than for phytoplankton, recent estimates suggest that this may not be true (Kirchman 2000, Gundersen et al. 2002).

According the above criteria, silicates were never limiting phytoplankton growth at the sites investigated and nitrogen was the principal factor limiting phytoplanktonic growth (Table III.4).

Elemental ratios give information about nutrient limiting phytoplankton growth. Unfortunately, application to bacterioplankton is not possible. Firstly, bacterioplankton is able to use organic nutrients, and DON and DOP covers a wide range of molecules with likely very different degradabilities. Bulk DON and DOP concentrations may not be therefore representative of nutrient availability to bacterioplankton growth. However, since DON:DOP ratio is on average (± SE) much larger (65 ± 4, excluding negatives values of DOP) than DIN:DIP ratio,

there is a probability that bacterioplankton could be more frequently P-limited than phytoplankton. Secondly, bacterioplankton C:P ratio varies in a much wider range than C:N ratio (50-fold in laboratory-grown pure cultures, Tezuka 1990). Finally, at the opposite of phytoplankton, bacterioplankton carbon limitation is likely to occur, especially in oligotrophic environments (Ducklow & Carlson 1992, Kirchman & Rich 1997, Ducklow 2000). The plasticity of bacterioplankton elemental composition and its ability to consume organic substrates with variable degradabilities suggest that other methods (like bioassays for instance) should be used to assess the limiting factor of bacterioplankton.

III.5.2.5. Environmental influences

We have shown that DIN is likely the principal factor limiting phytoplankton growth, therefore we tested the statistical relationship between DIN and biological variables. We were unable to show any significant correlation. Variations of biological variables are more important than those of nutrient concentrations and of course many other parameters may have influenced biological trends.

Environmental variables showed an important short-term variability throughout the year (Figure III.6) and may explain the short-term variations of biological variables. Douillet et al. (2001) showed that the semi-diurnal tide and, more importantly, wind-induced advection were the two main factors driving water currents in the SW New Caledonia lagoon. In a first attempt to realize a simulation of biogeochemical processes in the lagoon, Bujan et al. (2000) suggested a relatively constant Chl.*a* concentration throughout the year. According to these simulations, the influence of nutrient and terrigeneous inputs on the phytoplanktonic biomass is punctual and lasts only a few days. According Bujan et al. (2000) the pelagic system is strongly influenced by physical processes; *i.e.* wind prevailing all along the year induces a rapid renewal of lagoon water by oceanic water, and maintains oligotrophic conditions on average. Pinazo et al. (2004) confirmed this using a three-dimensional model coupling biogeochemical fluxes with hydrodynamic processes. Modeled phytoplankton biomass dynamics were strongly correlated with both freshwater nutrient inputs and wind-driven hydrodynamic processes, the latter resulting in a large input of oceanic water from the southeast part of the lagoon under trade wind conditions.

During this study, precipitation which lead to increased loads of nutrients in the water column from increased river runoff did not show a significant correlation with biological variables.

Since wind stress is responsible for a large part of the renewal of lagoon waters by oceanic waters (Douillet et al. 2001), we also tested the effect of wind stress on biological variables. For this purpose, wind stress was expressed as the square of wind speed projected on the 110° axis (average direction of prevailing trade winds) and different time lags were assayed. Only wind stress averaged on the three days before sampling showed a weak, but significant negative correlation with Chl.*a* ($r = 0.35$, $p < 0.05$) at station N12. Although this does not demonstrate a causal relationship, this statistical relationship is in agreement with the fact that oligotrophic conditions are maintained by wind-induced renewal of lagoon waters. In another study, Ouillon et al. (*pers com*) found as well, a significant negative correlation between the square of wind speed projected on the 110° axis averaged three days before and the turbidity in the Sainte-Marie Bay.

Temperature is a factor well known to have an influence on bacterial production (Shiah & Ducklow 1994) and primary production (Norberg & DeAngelis 1997). At station M33, bacterial production is positively correlated to the temperature ($r = 0.47$, $n = 38$, $p < 0.01$), and this relationship is stronger at station N12 ($r = 0.79$, $n = 33$, $p < 0.001$). Even if temperature explains a part of the variance of bacterial production, many authors (Bott 1975, Autio 1992, Hoch and Kirchman 1993, Shiah et al. 1999) emphasize that this is observable only under conditions where substrate supply is not limiting. This could explain the better correlation and the more important seasonal variation at the most anthropized station (N12) with higher nutrient concentrations. In order to evaluate the temperature effect on relative maxima of bacterial production occurring at the warm season, BP estimates at *in situ* temperature were normalized to the same temperature. For this purpose, Q10 for bacterial production were estimated periodically on bacterioplankton assemblages collected at stations N12 and M33. Average $Q10_{(20\text{-}30°C)}$ was not significantly different for N12 and M33 bacterioplankton, and the average (±SE) for all determinations was 2.19 ± 0.15 (n=9, data not shown). At station M33, the relative maxima of BP estimated at *in situ* temperature in January (4.2-fold) and March-April (2.9-fold) were reduced to 3.3 and 2.3-fold, respectively, when normalized to 25°C. In a similar way, at station N12, the relative maxima of BP estimated at *in situ* temperature in December-January (3.0-fold) and March (3.0-fold) were reduced to 2.4 and 2.3-fold, respectively, when normalized to the same temperature. Although temperature effect could explain a part of the increase of bacterioplankton production during summer, most of these increases were likely due to resource availability.

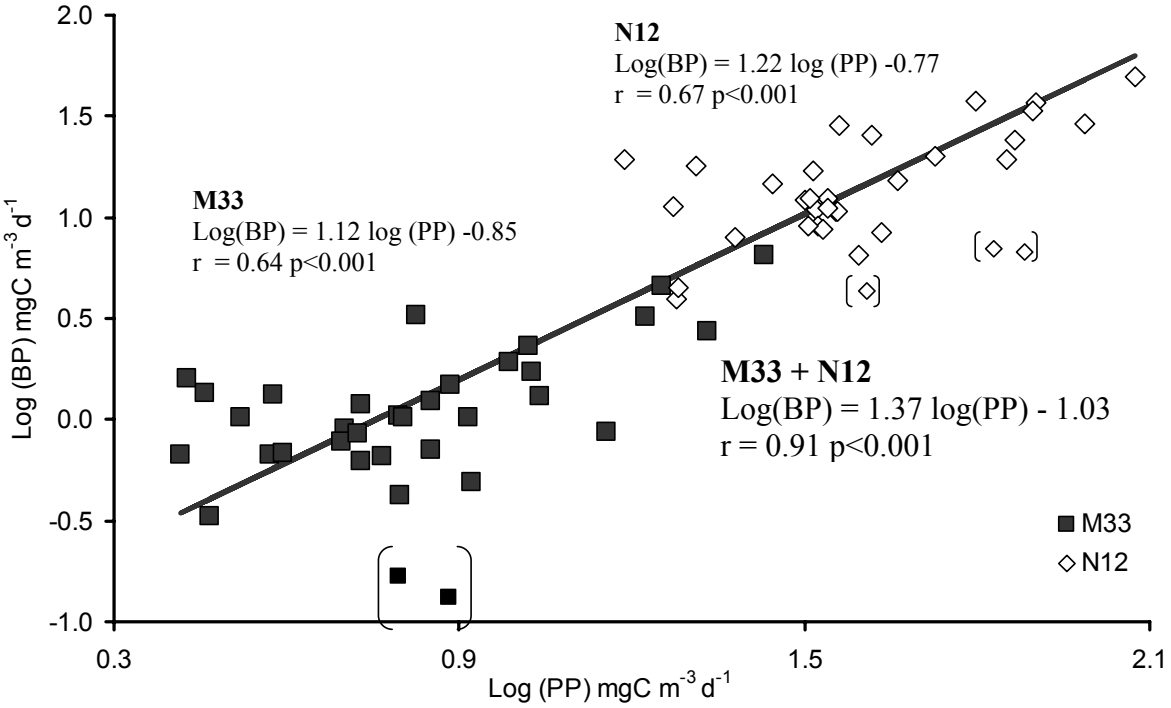


Figure III.12 - Plot of log bacterial production (BP) versus log primary production (PP) at stations M33 and N12. Lines represent model II regressions. Outliers in brackets are excluded from the regression fits.

III.5.2.6. Relationships between bacterial and primary production

One interest of surveying a limited number of stations over an annual cycle is to compare bacterial production to primary production. Comparing these values over a whole year should prevent from misinterpretations due to time lags between both processes, often observed in temperate climates. More precisely, our aim was to examine if phytoplankton production was able to fulfill bacterioplankton carbon requirements at the two stations of contrasted trophic status.

On a volumetric basis, significant linear correlations ($p \leq 0.01$) can be observed between log (BP) and log (PP), at the two stations (Figure III.12). Comparison of the confidence intervals shows that the regression slopes are not statistically different. Data of stations M33 and N12 were combined and a linear regression was fitted with a higher regression coefficient. Confidence interval 95% (1.22-1.52) indicates that bacterial production increases faster than primary production. On average BP represents 19 ± 2% of PP at M33, and 39 ± 4% of PP at N12.

Bacterial Carbon Demand (BCD), *i.e.* the amount of carbon needed to support bacterial production and respiration was computed from estimates of bacterial production and Bacterial Growth Efficiency (BGE). BGE was determined in 0.6 µm-filtered bacterioplankton seawater cultures in order to eliminate predators and phytoplankton from natural bacterioplankton assemblages at stations of contrasted trophic status (Briand et al. 2004). Oxygen consumption determined using an oxygen microprobe was compared to net bacterial growth determined from epifluorescence counts. Application of the model from Del Giorgio & Cole (1998) to these data shows a significant fit ($r = 0.606$, $n = 24$) between BGE and BP (Figure III.13A). This relationship underlines that the more important is the bacterial production, the more elevated is bacterial growth efficiency. Indeed, higher bacterial production suggests a higher resource availability to bacterioplankton, in agreement with a higher conversion efficiency of organic carbon to bacterial carbon.

We utilized this regression fit to compute BGE corresponding to BP values and, over the whole range of BP values recorded along the seasonal surveys, mean (± SE) BGE was 10.3 ± 0.2 % at M33 and 19.6 ± 1.1 % at N12. These low values are in the same range than those determined in the oligotrophic Sargasso Sea (Carlson & Ducklow 1996). The BCD:PP ratio is on average 1.9 ± 0.2 at station M33 and 2.0 ± 0.2 at the eutrophic station N12 (Figure III.13B). Interestingly, while BP/PP ratio is nearly double at the mesotrophic station N12 compared to the

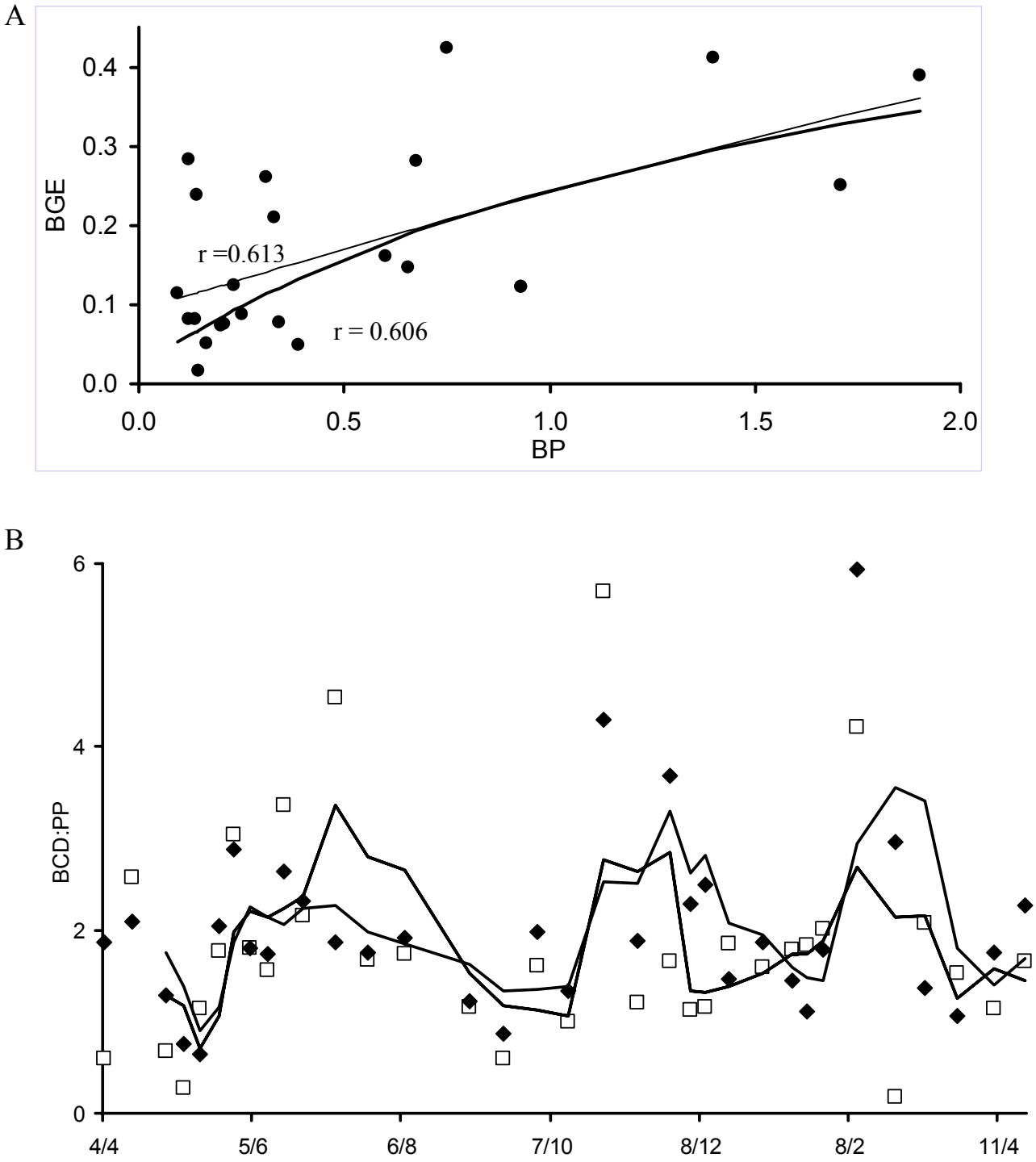


Figure III.13 – (A) Relationship between Bacterial Growth Efficiency (BGE) and Bacterial Production (BP, mgC m^{-3} h^{-1}). Data from Briand et al. (2004). The bold line indicates Del Giorgio model (Del Giorgio & Cole 1998) and the thin line the best fit using the same type of model (BGE = (1.194 + 2.20 × BP) / (13.0 + BP), see text). (B) Temporal variations of the ratio of Bacterial Carbon Demand to primary production (BCD:PP) at stations M33 (□) and N12(♦). Lines are 3-periods moving averages.

oligotrophic station M33, differences in BGE lead to rather similar BCD:PP ratios. These ratios suggest that, since benthic primary production is not significant at both these stations (Pringault, unpublished data), particulate primary production alone is insufficient to support bacterioplankton carbon demand at both stations. Dissolved primary production was not determined during this study. According to these BCD:PP ratios, dissolved primary production should represent 100% of particulate primary production in order to fulfill bacterioplankton demand. The first estimates show that it could represent up to 60% of particulate primary production in the SW lagoon (Rochelle-Newall, unpublished data). Since the percent of ^{14}C-DOM released from phytoplankton is believed to decrease with increasing trophic status (Moran & Estrada 2002, Moran et al 2002, but see Maranon et al. 2004), this could lead to differences in BCD:BP ratios between these two stations. Future work should be done to estimate dissolved primary production in the SW lagoon of New Caledonia. An alternative explanation would be the use of allochtonous DOM to fuel bacterioplankton carbon demand.

However, one must take caution when interpreting BCD data, as they are based on BGE determined by still limited analytical capabilities (Briand et al. 2004) and BP obtained using conversion factors which may vary widely (Ducklow & Carlson 1992). Moreover the model linking BGE and BP is still very imprecise with r=0.606. For instance, using 95% confidence limits of this model would give average BCD:PP ratios ranging from 1.1 to 4.8 at M33, and 1.3 to 5.0 at N12). In that way, even though BGE and conversion factors for thymidine based bacterial production were estimated for this study area, possible biases or imprecision in the values may result to a BCD greater than PP, even in an oligotrophic water column remote from the influence of allochtonous inputs (Carlson et al. 2002), like at station M33.

Finally, Strayer (1988) expressed the idea confirmed by Scavia (1988) that direct comparison of bacterial carbon demand to primary production may lead to wrong interpretations. The carbon demand summed over all secondary producers may exceed primary production alone when organic carbon is recycled several times in the water column. Carbon recycling may also explain a relative excess of bacterioplankton carbon demand compared to primary production in retentive ecosystems.

III.6. CONCLUSION

This study constitutes a first attempt at describing variations of phytoplankton biomass, primary production and bacterial production at different time scales ranging from hours to seasons and under different trophic status in the southwest lagoon of New Caledonia.

During stable meteorological conditions, we have shown weak but consistent daily variation of Chl.*a* concentration, bacterial production and nutrient concentrations. However, these slight variations show that punctual measurement of planktonic variables may be extrapolated to daily value with a reasonable approximation.

This study shows the importance of the short-term variation of planktonic variables in comparison with seasonal variations in both oligotrophic and mesotrophic waters of this tropical coastal ecosystem. Sampling at a relatively high frequency (week) is required in order to assess seasonality of planktonic processes.

Even if seasonal variations are weak, phytoplankton biomass and production and bacterial production of biomass showed a consistent pattern during the sampling year with maximal values around April-May and December- January and minimal values around August. This was observed at two stations of contrasted trophic status, however variations were generally more pronounced in the eutrophic Sainte-Marie Bay than in the main lagoon channel. Mineral nutrient availability indicates that nitrogen is probably the first limiting factor of phytoplankton communities throughout the year with few exceptions. Short term variations are likely related to hydrodynamics of the lagoon, but this was not easy to demonstrate using our data set. Studies on residence time of water are in progress and will help to better understand short term hydrodynamics and, by the way, the variability of biological variables. The next step of the comprehension of influence of environmental factors on planktonic variations will need the use of a biogeochemical model coupled to the hydrodynamic model which is currently in progress.

Acknowledgements: This work was supported by the Institut Français de Recherche pour le Développement (IRD), and grants from the Programme National Environnement Côtier (PNEC) and the ZoNéCo programme. We express our gratitude to J. Bargibant, S. Tereua and A. Lapetite and the crew of the IRD RV 'Alis' for their efficient help during sample collection. Meteorological data were kindly provided by Meteo France and Pascal Douillet.

CHAPITRE IV

Réponses des communautés planctoniques aux accroissements locaux en nutriments

CHAPITRE IV. REPONSES DES COMMUNAUTES PLANCTONIQUES AUX ACCROISSEMENTS LOCAUX EN NUTRIMENTS

IV.1. INTRODUCTION

Les sources principales de nutriments dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie sont les apports terrigènes par les rivières et les apports anthropiques liés à la ville de Nouméa. Ces apports côtiers en nutriments conditionnent des gradients d'eutrophisation décroissants des eaux de fond de baie vers les eaux lagonaires oligotrophes. Le système planctonique, premier maillon de la chaîne alimentaire, constitue un indicateur direct et sensible de l'état de l'écosystème et des changements qui y surviennent (Paerl et al. 2003). En effet, la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques, diffèrent fondamentalement entre les milieux oligotrophes, dominés par les réseaux trophiques microbiens, et les milieux eutrophes dominés par un réseau trophique "herbivore" (Legendre & Rassoulzadegan 1995). Ces modifications de la structure du réseau trophique microbien en réponse aux enrichissements nutritifs - notamment en terme de classes de taille phytoplanctoniques qui conditionnent directement le nombre et la nature des étapes de prédation - peuvent avoir des conséquences sur les cycles globaux au sein de l'écosystème en modifiant les flux de carbone et le recyclage des nutriments (Garrison et al. 2000). Ainsi, la connaissance des facteurs pouvant modifier la structure du réseau trophique microbien, comme l'enrichissement du milieu en nutriments, est essentielle à la compréhension des effets des activités humaine, préalable à toute opération de préservation de l'écosystème.

Les peuplements planctoniques des milieux lagonaires non perturbés semblent limités par les ressources nutritives, ce qui devrait les rendre particulièrement sensibles aux apports eutrophisants. Afin de contrôler l'eutrophisation d'un milieu il est nécessaire de déterminer l'élément le plus déterminant dans l'enrichissement. Peu de données sont disponibles sur la nature de la limitation nutritive en milieu lagonaire. Les principaux éléments pouvant limiter la production planctonique suivant les milieux marins étudiés sont l'azote et le phosphore (Smith 1984, Dufour & Berland 1999, Tyrrell 1999, Torréton et al. 2000, Wu et al. 2000), mais aussi les silicates (Bethoux et al. 2002) ou encore certains micronutriments comme le fer (Sakka et al.

1999, Boyd et al. 2000). Ainsi, la limitation nutritive varie selon les sites et les communautés étudiées. Il est donc impossible d'établir *a priori* la nature de cette limitation, et par conséquent de prédire les changements induits par les apports en nutriments occasionnés par l'activité humaine en milieu lagonaire.

A l'opposé des systèmes oligotrophes où les bactéries hétérotrophes sont considérées comme des compétiteurs efficaces du phytoplancton pour les éléments nutritifs (Kirchman, 1994, 2000), les bactéries hétérotrophes pourraient augmenter l'eutrophisation des milieux côtiers soumis à des apports extérieurs en matière organique, en conduisant à la libération d'une partie des éléments nutritifs contenus dans celle-ci. Une possibilité d'évaluer cette hypothèse sur le lagon de Nouméa est de comparer la production bactérienne à la production primaire. Si cette hypothèse est vérifiée, la production bactérienne devrait augmenter proportionnellement plus que la production primaire dans des conditions trophiques croissantes. La demande bactérienne en carbone (production bactérienne/efficacité de croissance) devrait ainsi atteindre, voire dépasser la production primaire aux sites les plus eutrophes[7].

Une première étude a permis de mettre en évidence des gradients significatifs d'enrichissements en nutriments dans des baies fortement anthropisées (Sainte-Marie, Grande Rade) et des baies moins altérées par les apports anthropiques (baies de Dumbéa et de Boulari) (Jacquet 2001). Le long de ces gradients, il était possible d'observer une augmentation de la concentration en chlorophylle *a*, de la production primaire et de la production bactérienne pour des concentrations croissantes en nutriments. Les corrélations entre variables biologiques et nutriments suggéraient par ailleurs que l'azote minéral dissous était le facteur le plus déterminant dans l'enrichissement trophique des eaux lagonaires de la zone étudiée. Toutefois, l'étude a été réalisée à une seule période de l'année, entre Mars et Avril 2001, elle ne tient donc pas compte des effets possibles de la saisonnalité, notamment des possibles variations du principal élément limitant (Sala et al. 2002), sur les réponses des compartiments phytoplanctonique et bactérien aux apports eutrophisants. L'étude des variations saisonnières des variables planctoniques montre en effet des maxima de biomasse phytoplanctonique, de production primaire et de production bactérienne en Avril-Mai et Décembre-Janvier, et un minimum en hiver (Août, cf. Chapitre III).

[7] La production primaire benthique lagonaire est essentiellement consommée au niveau des sédiments (Clavier & Garrigue, 1999). Elle n'est donc pas susceptible d'alimenter significativement la production bactérienne planctonique.

Les premiers objectifs du travail présenté ci-après sont ainsi :

(1) d'examiner si ces gradients d'eutrophisation sont significatifs aux 3 périodes clefs citées plus haut,

(2) d'évaluer quel est le macronutriment déterminant les réponses planctoniques aux apports,

(3) d'établir quelles sont les réponses des communautés bactérienne et phytoplanctonique à ces changements des ressources nutritives, en terme de biomasse, d'activité et de taux de croissance. Ce travail s'intéressera en particulier aux changements éventuels de taille des producteurs primaires afin d'en examiner les conséquences trophiques potentielles.

(4) de déterminer si la production bactérienne est liée à la production primaire. Un des objectifs est d'examiner combien représentent la production bactérienne de biomasse et la demande bactérienne en carbone en proportion de la production primaire particulaire. Ces pourcentages augmentent-ils avec l'eutrophisation ?

IV.2. ECHANTILLONNAGE ET VARIABLES MESUREES

Afin de répondre aux questions posées, nous avons choisi un ensemble de stations permettant, *a priori*, de couvrir une large gamme de valeurs trophiques. Les stations sont regroupées par radiale. Chaque radiale est constituée de six stations (Figure IV.1). Les différentes zones étudiées, donnant leur nom à la radiale correspondante sont la baie de Sainte-Marie, la Grande Rade, les baies de Boulari et de Dumbéa et la zone lagonaire. Les caractéristiques environnementales de ces zones sont décrites dans les Chapitres I et II.

Comme cela a déjà été évoqué plus haut, l'étude de l'évolution saisonnière des variables biologiques (cf. Chapitre III) a permis de mettre en évidence des périodes de maxima (Avril-Mai et Décembre-Janvier) et de minima (Août-Septembre) de la biomasse phytoplanctonique, de la production primaire et de la production bactérienne. Pour tenir compte des ces variations saisonnières les 5 radiales ont été échantillonnées à ces trois périodes contrastées de l'année (Avril-Mai 2002, Août 2002, Janvier 2003, les dates d'échantillonnage sont présentées dans le Chapitre II).

La colonne d'eau étant en moyenne assez homogène (cf. Chapitre III), les prélèvements ont été réalisés à 3 m de profondeur, afin d'éviter l'éventuelle dessalure de surface après de fortes pluies.

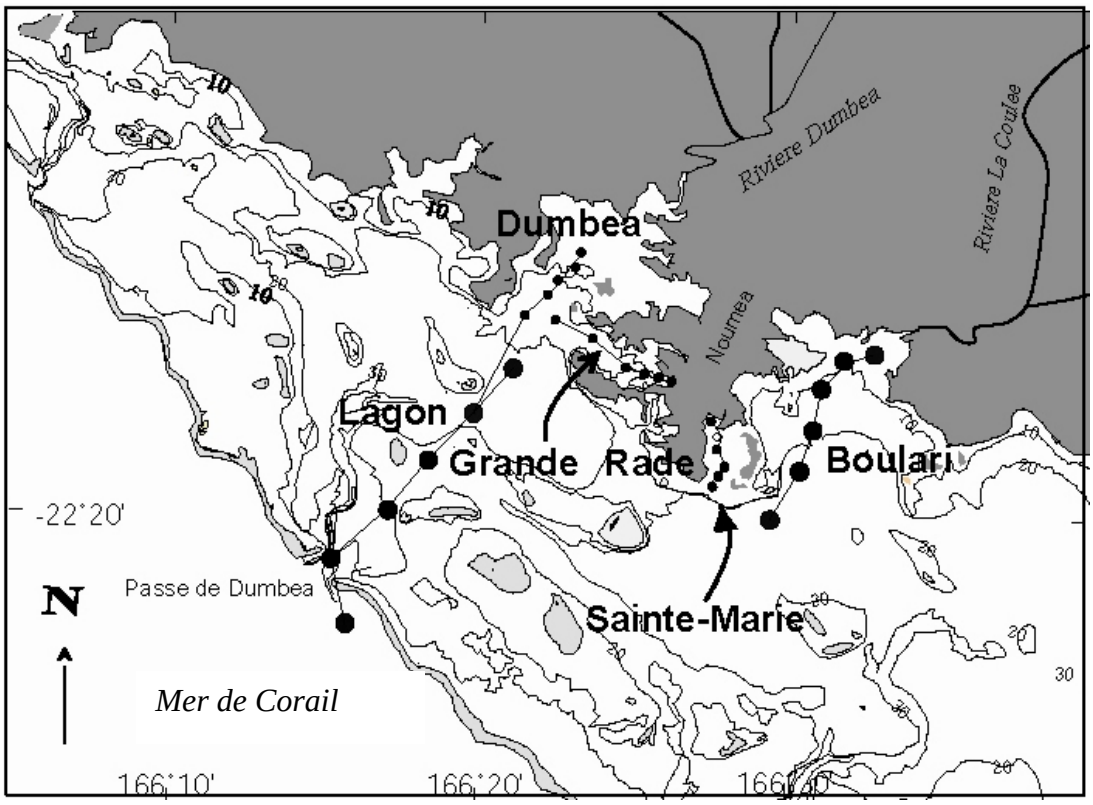


Figure IV.1 – Zones d'études et stations d'échantillonnages regroupées par radiales

Les variables déterminées peuvent être classées en deux groupes :

- Les variables biologiques qui sont : la biomasse phytoplanctonique obtenue par mesure de la concentration en chlorophylle *a* (totale, >2 µm, >10 µm), la production primaire (totale, >2 µm, >10 µm), l'abondance et la production bactériennes.
- Les variables physico-chimiques qui comprennent les éléments minéraux dissous (ammonium, nitrates, phosphates, silicates), et organiques (Azote Organique Total ou NOT et Phosphore Organique Total ou POT[8]) et les données physiques collectées au moyen d'une sonde CTD (température, salinité, turbidité, PAR).

Les différentes méthodes d'analyse sont décrites dans le Chapitre II de ce manuscrit.

[8] Les mesures d'azote et phosphore organique particulaire n'ont pu être faîtes, c'est pourquoi seule les données de matière organique totale sont présentées

IV.3. RESULTATS

IV.3.1. CONDITIONS TROPHIQUES

IV.3.1.1. Salinité, température

La salinité moyenne (± SE) sur l'ensemble des stations échantillonnées est de 35,30 ± 0,02. Elle varie peu suivant les saisons avec en moyenne (± SE) 35,05 ± 0,02 ; 35,43 ± 0,02 et 35,44 ± 0,02 pour les stations échantillonnées respectivement en Avril-Mai, Août et Janvier. La salinité décroît de la côte vers le large le long de chaque radiale, toutefois la différence maximale est en moyenne de 0,22 ± 0,0. Les variations de salinité sont donc modestes et ne devraient donc pas constituer une contrainte sur les biomasses et activités planctoniques.

La température moyenne (± SE) est de 25,4 ± 0,15 °C ; 21,1 ± 0,0 °C et de 27,8 ± 0,0 °C le long des radiales d'Avril-Mai 2002, d'Août 2002 et de Janvier 2003. De même que pour la salinité, la température varie peu le long d'une même radiale, avec en moyenne (± SE) 0,53 ± 0,10 °C de différence entre les stations les plus chaudes, proches de la côte, et les plus éloignées.

IV.3.1.2. Gradients d'enrichissements

La présence d'un gradient significatif a été testée le long de chaque radiale en effectuant des corrélations de rang de Spearman (Tableau IV.1). Les corrélations sont rarement significatives pour les variables physico-chimiques, excepté pour les phosphates. Sur les variables biologiques où les mesures sont plus sensibles que pour les précédentes variables, les gradients d'eutrophisation se vérifient plus fréquemment. La concentration en chlorophylle *a*, la production primaire et la production bactérienne décroissent de manière significative le long de la plupart des radiales. L'abondance bactérienne et les taux de croissance bactérien et phytoplanctonique présentent peu de différences significatives le long des radiales.

L'application de ce test à un faible nombre de données (n = 6 par radiale) et sa robustesse ne permettent pas de mettre en évidence de manière statistique des gradients trophiques côte-large pourtant mesurables. Ainsi l'azote minéral dissous, dont les corrélations de rang de Spearman mettent en évidence l'existence de gradients significatifs sur deux radiales seulement, montre néanmoins en moyenne des gradients côte-large sur l'ensemble des radiales en Grande Rade et en baie de Sainte-Marie. Les phosphates et les silicates montrent également des gradients d'enrichissements dans certaines baies. Les concentrations en NOT varient peu le long de radiales (Figure IV.2).

Les gradients d'enrichissement les plus forts de l'abondance phytoplanctonique et des productions bactérienne et primaire sont mesurés en Grande Rade et en baie de Sainte-Marie. L'abondance bactérienne ne montre pas de décroissance de la côte vers le large (Figure IV.3).

Tableau IV.1 - Structure de chaque radiale. Corrélations de rang de Spearman entre données et stations (1 à 6 à chaque radiale) en attribuant 1 aux stations les plus proches de la côte. * : p<0,05; ** : p<0,01; autrement non significatif). Toutes les tendances représentent une décroissance de la côte au large sauf les cases grises qui désignent le gradient inverse. PO_4 : phosphate, NO_3+NO_2 : nitrate + nitrites, NH_4 : ammonium, NID : azote minéral dissous (NH_4 + NO_3+NO_2), SiO_2 : silicates, NOT : Azote Organique Total, POT : Phosphore Organique Total Chl.*a* : chlorophylle *a*, PP : production primaire, PP /Chl.*a* : taux de croissance phytoplanctonique, NBact : abondance bactérienne, PB : production bactérienne, µBact : taux de croissance bactérien.

		PO_4	NO_2 +NO_3	NH_4	NID	SiO_2	NOT	POT	Chl.*a*	PP	PP/Chl.*a*	NBact	PB	µBact
Avril-Mai 2002	Grande Rade	**	**	*	**	**			**	**				*
	Sainte Marie							**	*	**			*	**
	Dumbéa	*							*	**			*	
	Boulari					**			*	*				
	Lagon									*	*			
Août 2002	Grande Rade	*	*	*	*	*		*	*	**			*	
	Sainte Marie	*	*			*		*		**			**	*
	Dumbéa	*		*		*			**	**	**		*	
	Boulari	**				**	*			**				
	Lagon		*											
Janvier 2003	Grande Rade					*	*		*	*				
	Sainte Marie							**	*	**			**	
	Dumbéa					*	**	**	**	*				
	Boulari	**	*					*	**	**				
	Lagon	**						*						
Relations significatives		8/15	5/15	3/15	2/15	8/15	3/15	7/15	10/15	13/15	2/15	0/15	6/15	3/15

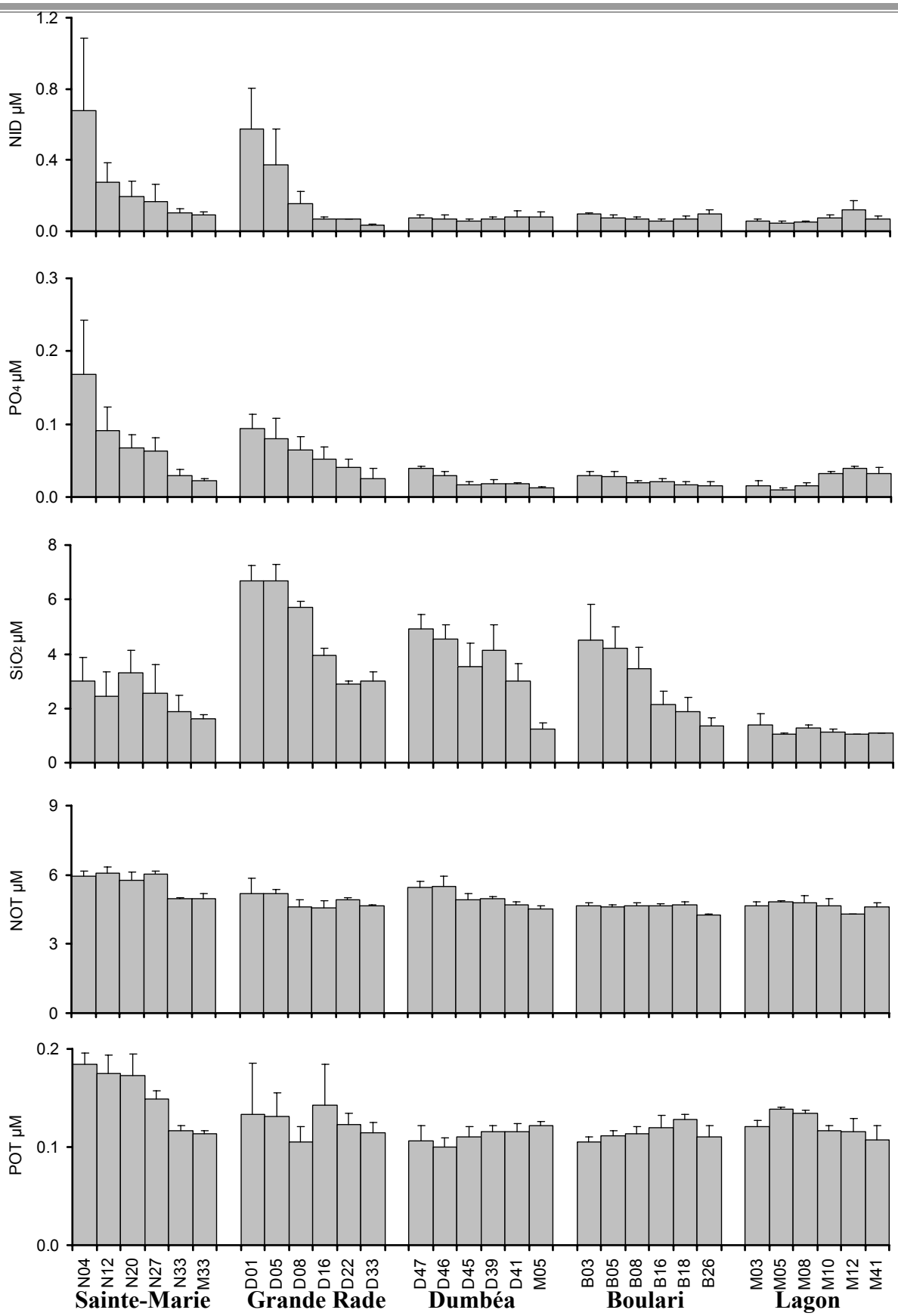


Figure IV.2 – Moyennes (±SE) des concentrations en nutriments sur les trois périodes pour les cinq radiales échantillonnées. Pour chaque radiale, les symboles de gauche à droite représentent les stations de la côte vers le large. Pour la légende des symboles se référer au Tableau IV.1

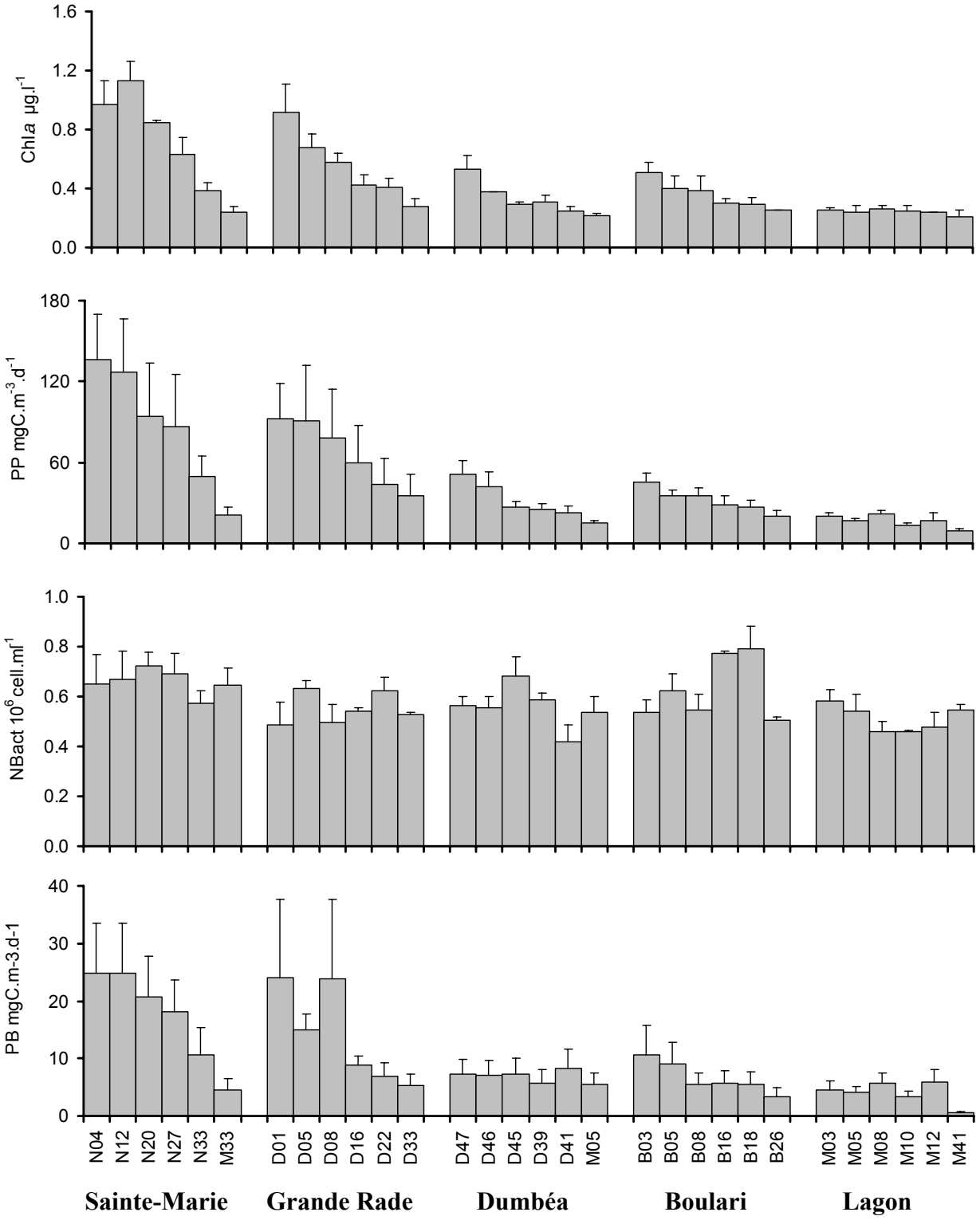


Figure IV.3 – Moyennes (±SE) des activités et biomasses phytoplanctonique et bactérienne sur les trois périodes pour les cinq radiales échantillonnées. Pour la légende des symboles se référer au Tableau IV.1

IV.3.1.3. Etendue des conditions trophiques

Variables physico-chimiques

Les concentrations en azote minéral dissous et phosphate les plus fortes ont été mesurées en Août. Les valeurs les plus fortes de silicates ont été mesurées en Avril-Mai (Tableau IV.2). Les concentrations en NID et PO_4 sont généralement faibles avec des valeurs souvent inférieures à 0,55 µM et 0,15 µM, respectivement. Les silicates montrent une distribution des concentrations plus homogène que pour les deux autres nutriments avec des valeurs comprises entre 0 et 7 µM (Figure IV.4.).

Les concentrations les plus fortes en NOT et POT ont été mesurées en Août 2002, ainsi qu'en Avril-Mai pour le POT (Tableau IV.2). Les concentrations de NOT sont généralement comprises entre 4,25 et 5 µM et celles de POT entre 0,09 et 0,15 µM.

Tableau IV.2 – Valeurs minimales, maximales et moyennes des variables physico-chimiques pour l'ensemble des radiales. Min, max : valeurs minimale et maximale, moy ± SE : moyenne ± Erreur standard. Pour la légende des autres symboles se référer au Tableau IV.1.

		NID *µM*	**PO_4** *µM*	**SiO_2** *µM*	**NOT** *µM*	**POT** *µM*
Avril-Mai 2002	min	0,04	0,00	1,01	3,68	0,02
	max	1,14	0,15	7,98	6,36	0,24
	moy ± SE	0,20 ± 0,04	0,05 ± 0,01	3,87 ± 0,38	4,93±0,12	0,12±0,01
Août 2002	min	0,02	0,01	1,11	4,10	0,11
	max	1,67	0,35	6,71	6,52	0,24
	moy ± SE	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,01	3,12 ± 0,30	5,01±0,12	0,14±0,01
Janvier 2003	min	0,02	0,00	0,69	3,98	0,07
	max	0,26	0,07	6,35	6,54	0,17
	moy ± SE	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,00	2,07 ± 0,30	4,96±0,12	0,11±0,00
Toutes les radiales	min	0,02	0,00	0,69	3,68	0,02
	max	1,67	0,35	7,98	6,54	0,24
	moy ± SE	0,14 ± 0,02	0,04 ± 0,00	3,05 ± 0,21	4,97±0,07	0,13±0,00

Variables biologiques

Comme pour les nutriments, les valeurs des variables biologiques sont le plus souvent faibles (Tableau IV.3 et Figure IV.5). Malgré une valeur maximale mesurée de 1,42 $\mu g.l^{-1}$, la chlorophylle *a* n'excède 1 $\mu g.l^{-1}$ que dans 5 cas sur les 88 stations échantillonnées. L'abondance bactérienne se répartit sur une gamme de valeur réduite avec 61 % des valeurs comprises entre 0,47 et 0,70 10^6 $cell.ml^{-1}$. En moyenne, la biomasse phytoplanctonique et les productions phytoplanctoniques et bactérienne sont plus fortes en Avril-Mai 2002 et Janvier 2003 qu'en août 2002.

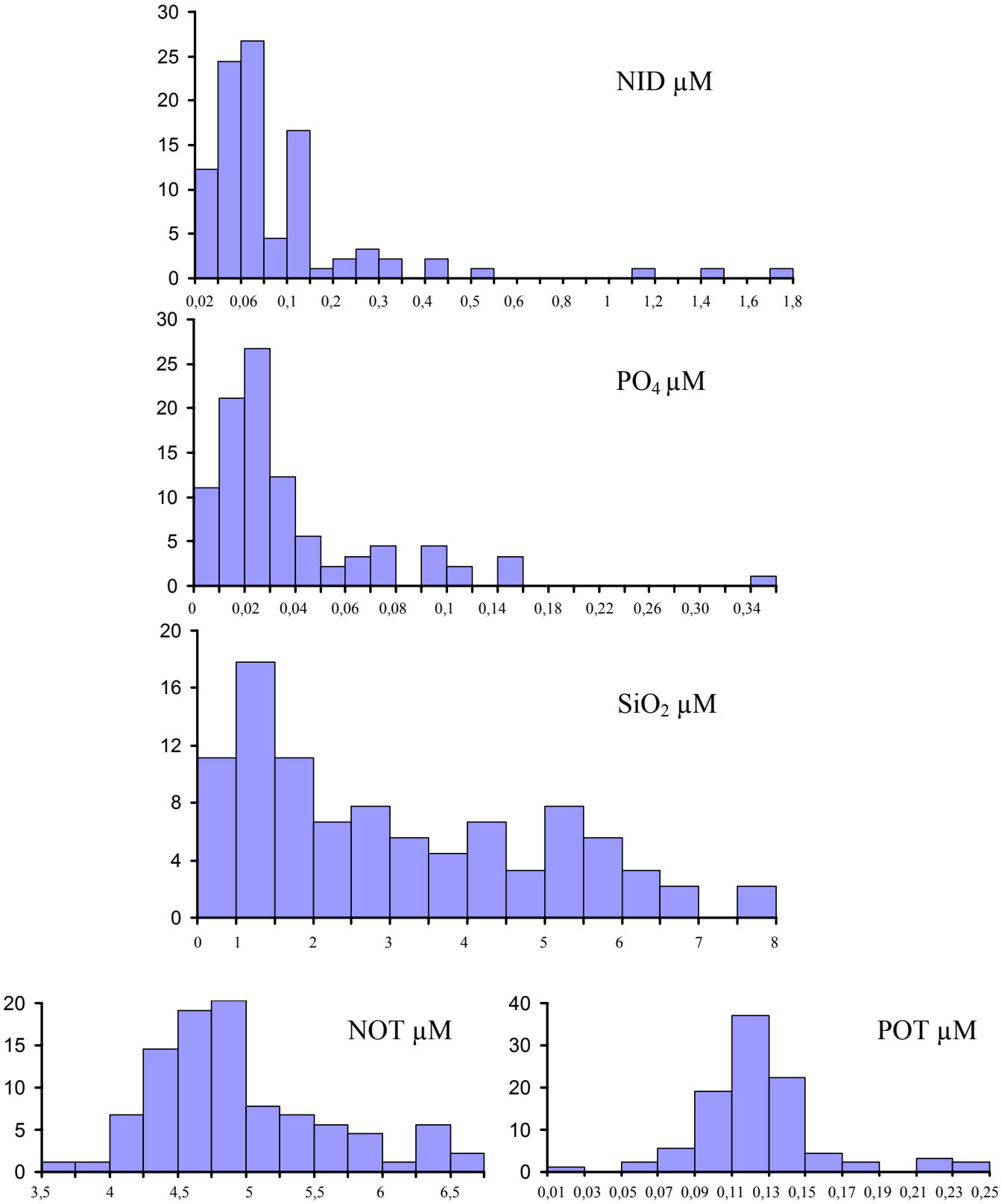


Figure IV.4 – Distribution des variables physico-chimiques par fréquence en %. Pour la légende des symboles se référer au Tableau IV.1

Tableau IV.3 – Valeurs minimales, maximales et moyennes des variables biologiques pour l'ensemble des radiales. Pour la légende des symboles se référer aux Tableau IV.1 et IV.2

		Chl.*a* *µg.l-1*	**PP** *mgC.m^{-3}.d^{-1}*	**NBact** *10^{6} cell.ml^{-1}*	**PB** *mgC.m^{-3}.d^{-1}*
Avril-Mai 2002	min	0,20	5,70	0,44	0,35
	max	1,42	220,97	0,99	21,55
	moy ± SE	0,50 ± 0,06	75,90 ± 12,05	0,60 ± 0,02	7,71 ± 1,02
Août 2002	min	0,19	11,02	0,25	0,52
	max	0,90	79,36	0,94	9,89
	moy ± SE	0,37 ± 0,04	23,41 ± 2,82	0,66 ± 0,03	3,12 ± 0,47
Janvier 2003	min	0,11	7,11	0,37	0,92
	max	1,36	143,81	0,77	57,62
	moy ± SE	0,44 ± 0,06	39,63 ± 5,38	0,51 ± 0,02	18,33 ± 2,71
Toutes les radiales	min	0,11	5,70	0,25	0,35
	max	1,42	220,97	0,99	57,62
	moy ± SE	0,44 ± 0,03	46,57 ± 5,10	0,59 ± 0,02	9,80 ± 1,20

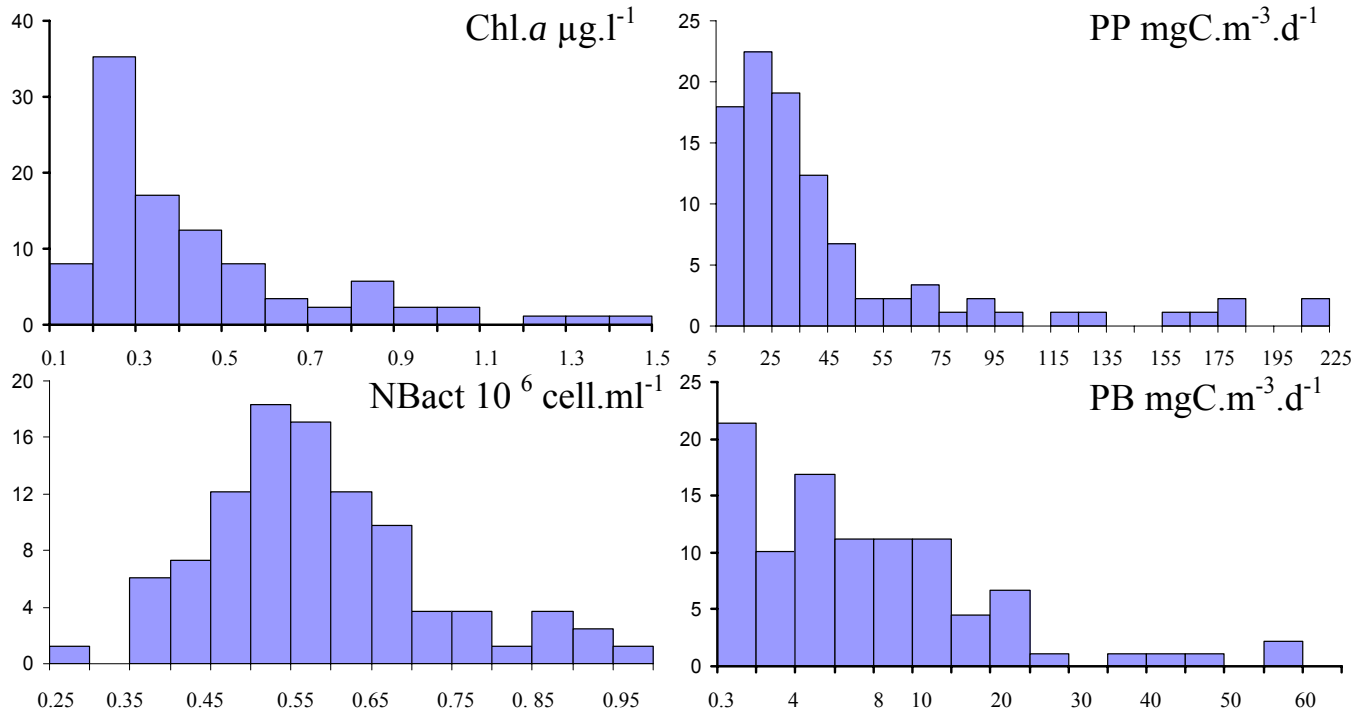


Figure IV.5 – Distribution des variables biologiques par fréquence en %. Pour la légende des symboles se référer au Tableau IV.1

Tableau IV.4 – Coefficients de corrélation et degrés de signification des relations entre variables biologiques et nutriments minéraux dissous. r : coefficient de corrélation, n : nombre de données, *** : $p \leq 0{,}001$, ** : $p \leq 0{,}01$, * : $p \leq 0{,}05$, NS : Non Significatif. Légende des autres variables cf. Tableau IV.1.

Ensemble des radiales

	PO_4			NO_3+NO_2			NH_4			NID			SiO_2		
	r		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**
Chl.*a*	0,676	***	84	0,510	***	85	0,450	***	85	0,494	***	85	0,322	***	85
PP	0,699	***	85	0,655	***	86	0,387	***	87	0,441	***	87	0,372	***	87
PP/Chl.*a*	0,550	***	81	0,484	***	81	0,471	***	81	0,396	***	81	0,263	NS	81
PB	0,153	NS	83	0,141	NS	84	0,071	NS	84	0,104	NS	80	0,167	NS	84
NBact	0,346	**	80	0,205	NS	81	0,357	**	82	0,359	***	82	0,040	NS	82
µBact	0,141	NS	77	0,127	NS	78	0,078	NS	78	0,102	NS	78	0,081	NS	78

Avril – Mai 2002

	PO_4			NO_3+NO_2			NH_4			NID			SiO_2		
	r		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**
Chl.*a*	0,861	***	27	0,647	***	28	0,586	***	28	0,638	***	28	0,643	***	28
PP	0,909	***	28	0,655	***	29	0,595	***	29	0,677	***	29	0,56	***	29
PP/Chl.*a*	0,724	***	25	0,429	NS	25	0,408	NS	25	0,456	NS	25	0,617	**	25
PB	0,698	***	29	0,522	**	30	0,409	*	30	0,476	**	30	0,484	**	30
NBact	0,511	**	26	0,427	*	27	0,357	NS	27	0,403	*	27	0,392	*	27
µBact	0,705	***	27	0,533	**	28	0,464	*	28	0,514	**	28	0,493	**	28

Août 2002

	PO_4			NO_3+NO_2			NH_4			NID			SiO_2		
	r		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**
Chl.*a*	0,924	***	28	0,718	***	28	0,630	***	28	0,684	***	28	0,231	NS	28
PP	0,908	***	28	0,781	***	28	0,810	***	28	0,826	***	28	0,261	NS	28
PP/Chl.*a*	-0,254	NS	26	-0,125	NS	26	-0,150	NS	26	-0,154	NS	26	-0,013	NS	26
PB	0,782	***	28	0,607	***	28	0,674	***	28	0,676	***	28	0,353	NS	28
NBact	0,417	*	24	0,257	NS	24	0,400	*	24	0,402	*	24	-0,094	NS	24
µBact	0,733	**	22	0,665	***	22	0,739	***	22	0,740	***	22	0,061	NS	22

Janvier 2003

	PO_4			NO_3+NO_2			NH_4			NID			SiO_2		
	r		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**
Chl.*a*	0,628	***	29	0,653	***	29	0,502	**	29	0,651	***	29	0,145	NS	29
PP	0,704	***	29	0,733	***	29	0,516	**	29	0,704	***	29	0,130	NS	29
PP/Chl.*a*	-0.032	NS	30	-0,085	NS	30	-0,089	NS	30	-0,098	NS	30	-0,115	NS	30
PB	0,592	***	26	0,631	***	26	0,301	NS	26	0,534	**	26	0,464	NS	26
NBact	- 0,324	NS	30	- 0,360	NS	30	- 0,039	NS	30	- 0,228	NS	30	- 0,220	NS	30
µBact	0,701	***	28	0,750	***	28	0,544	**	28	0,718	***	28	0,184	NS	28

IV.3.2. LIMITATION NUTRITIVE

La détermination de l'élément principal limitant la croissance planctonique peut se faire par l'étude : (1) des ratios des concentrations en nutriments minéraux dissous (Dortch & Whitledge 1992, Justic et al. 1995), (2) des relations *in situ* entre les variables biologiques et les nutriments (Cole et al. 1988, White et al. 1991), (3) des taux d'assimilations bactériens ou phytoplanctoniques (Thingstad et al. 1998, Zubkov et al. 2001), et (4) des réponses des compartiments planctoniques à des enrichissements (Sakka et al. 1999, Torréton et al. 2000, Ault et al. 2000, Sala et al. 2002). Cette étude fournit une opportunité d'examiner au moyen des concentrations et ratios entre nutriments quel est ou quels sont les éléments limitants la production primaire. L'examen des relations statistiques entre biomasses et activités planctoniques d'une part et nutriments d'autre part permet d'examiner ci ces relations statistiques sont en accord avec l'approche précédente.

IV.3.2.1. Limitation nutritive par les concentrations et ratios

Comme évoqué en Introduction (cf. I.1.2.1.3.) la détermination de l'élément limitant par la méthode des concentrations en nutriments est basée sur les critères suivants (Justic et al. 1995). Les concentrations doivent être inférieures aux seuils déterminés à partir des taux d'uptake du phytoplancton (NID $\leq$ 1 µM, $PO_4 \leq$ 0,1 µM et $SiO_2 \leq$ 2 µM), et l'élément limitant est ensuite déterminé à partir des ratios. Le phosphore est limitant si $SiO_2/PO_4 > 22$ et $NID/PO_4 > 22$, l'azote est limitant si $NID/PO_4 <10$ et Si/DIN > 1, et les silicates sont limitants si $SiO_2/PO_4 <10$ et $SiO_2/NID <1$.

En appliquant ces conditions aux concentrations mesurées sur l'ensemble des stations, le phosphore et les silicates sont limitants dans 1 cas sur 90, et l'azote dans 83 cas. Seulement 5 cas ne suggèrent aucune limitation par N, P ou Si. Cette approche suggère donc que l'azote minéral dissous est le premier élément limitant la croissance phytoplanctonique et bactérienne.

IV.3.2.2. Limitation nutritive par les relations statistiques *in situ*

Les relations entre les différentes variables indicatrices des peuplements planctoniques primaires et bactériens et les éléments nutritifs ont tout d'abord été établies pour l'ensemble des stations (Tableau IV.4). Les variables spécifiques du phytoplancton montrent toutes des corrélations positives significatives avec tous les nutriments. Concernant les peuplements bactériens, seule la biomasse bactérienne est corrélée de manière significative avec les phosphates, l'ammonium et l'azote minéral dissous.

Lorsque les relations sont établies par saison d'échantillonnage (Tableau IV.4), la biomasse phytoplanctonique et la production primaire sont également reliées de manière significative avec l'ensemble des nutriments, quelle que soit la période considérée. Le rapport PP/Chl.*a* (indicateur du taux de croissance du phytoplancton hors influence de la lumière) est corrélé de manière significative au phosphore et aux silicates en Avril-Mai, et à aucun des 3 éléments en Août et en Janvier. A l'inverse de ce qui est observé en cumulant toutes les radiales, lors du traitement par saison, la production, la biomasse et le taux de croissance bactériens sont reliés de manière significative à la plupart des éléments nutritifs, ce qui montre que ces relations sont différentes pour chaque saison étudiée.

Les éléments nutritifs covarient de manière très hautement significative (Tableau IV.5). La détermination du premier élément limitant ne peut donc se faire sur les corrélations globales. Les corrélations partielles ont donc été déterminées entre les différentes variables biologiques et les éléments nutritifs (Tableau IV.6). Toutes les variables planctoniques (excepté le taux de croissance phytoplanctonique en août 2002) sont corrélées avec les phosphates lorsque la variance des deux autres nutriments est retirée. L'approche par les relations *in situ* entre variables biologiques et nutriments suggère donc que le phosphate est le premier élément limitant la croissance des organismes planctoniques.

Tableau IV.5 – Coefficient de corrélation et leur degré de signification entre les nutriments minéraux dissous. Légende cf. Tableau IV.1

	PO_4	NO_3+NO_2	NH_4	NID	SiO_2
PO_4	1	0,739 ***	0,730 ***	0,764 ***	0,417 ***
NO_3+NO_2		1	0,836 ***	0,941 ***	0,385 ***
NH_4			1	0,973 ***	0,388 ***
NID				1	0,403 ***
SIO_2					1

Tableau IV.6 – Corrélations partielles entre les variables biologiques et les phosphates, l'azote minéral dissous et les silicates. Chaque élément nutritif a été testé successivement en contrôlant les deux autres. 1 : la corrélation reste significative et représente le premier élément limitant, 2 : la relation reste significative mais est moins importante qu'avec le premier élément. NS : la relation n'est plus significative. Pour la légende des autres symboles se reporter au Tableau IV.1. (aucune relation significative entre variables biologiques et silicates en août 02 et janvier 03)

	Avril Mai 2002			Août 2002		Janvier 2003	
	PO_4	NID	SIO_2	PO_4	NID	PO_4	NID
Chl.*a*	1	NS	2	1	NS	1	1
PP	1	NS	2	1	NS	1	1
PP/Chl.*a*	1	NS	2	NS	NS	NS	NS
PB	1	NS	NS	1	NS	1	1
NBact	1	NS	NS	1	NS	NS	NS
µBact	1	NS	NS	1	NS	1	1

IV.3.3. REPONSES DES COMMUNAUTES PLANCTONIQUES AUX ENRICHISSEMENTS LOCAUX

IV.3.3.1. Evolution de la contribution des classes de taille phytoplanctonique à la biomasse et activité totale

Les pourcentages de chlorophylle *a* et de production primaire dans la fraction <2 µm décroissent de manière très hautement significative avec les phosphates, l'azote minéral dissous et les silicates (excepté pour la production primaire). A l'opposé, les pourcentages de chlorophylle *a* et de production primaire dans la fraction 2-10 µm augmentent de manière significative avec les phosphates, l'azote minéral dissous et les silicates. Aucune relation significative n'est mise en évidence entre chlorophylle *a* et production primaire de la fraction >10 µm et les concentrations en nutriments (Tableau IV.7).

Tableau IV.7 – Coefficients de corrélation et leur degré de signification entre proportions de la chlorophylle *a* ou la production primaire dans différentes classes de taille et les nutriments minéraux dissous.

	PO_4			NID			SIO_2		
	r		**n**	**r**		**n**	**r**		**n**
chlorophylle *a* **%<2 µm**	-0,515	***	82	-0,512	***	82	-0,322	**	82
chlorophylle *a* **%2-10µm**	0,503	***	83	0,625	***	83	0,402	***	83
chlorophylle *a* **%>10µm**	0,223	NS	83	0,054	NS	83	-0,089	NS	83
production primaire **%<2µm**	-0,382	***	86	-0,290	**	86	-0,050	NS	86
production primaire **%2-10µm**	0,414	***	85	0,278	***	85	0,375	***	85
production primaire **%>10**µm	0,131	NS	86	0,074	NS	86	-0,207	NS	86

IV.3.3.2. Taux de croissance phytoplanctonique

L'augmentation de la classe de taille entre 2 et 10 µm en réponse aux enrichissements est nette tant en terme de biomasse que de production primaire. Cette augmentation peut être due à un taux de croissance supérieur du phytoplancton compris entre 2 et 10µm et/ou un contrôle descendant plus faible sur cette classe de taille. Si l'on admet que les rapports C/Chl.*a* sont similaires dans chaque classe de taille, le rapport PP/Chl.a peut fournir une estimation approchée du taux de croissance phytoplanctonique dans chaque classe de taille.

Un test d'égalité des espérances pour des observations non pairées a été appliqué sur ces rapports pour l'ensemble des stations (Tableau IV.8). Ce test montre que le taux de croissance phytoplanctonique de la fraction <2 µm est supérieur à celui de la fraction 2-10 µm, lui-même

supérieur à celui de la fraction >10 µm. L'augmentation du pourcentage dans la classe de taille 2-10 µm n'est donc pas due à un taux de croissance supérieur.

Tableau IV.8 – Test d'égalité des espérances pour des observations non appariées entre les rapports production primaire/chlorophylle *a* (µ) pour chaque fraction de taille.

	$\mu_{(<2\mu m)}$ et $\mu_{(2\text{-}10\mu m)}$	$\mu_{(2\text{-}10\mu m)}$ et $\mu_{(>10\mu m)}$	$\mu_{(<2\mu m)}$ et $\mu_{(>10\mu m)}$
Statistique t	2,06	1,71	2,97
Valeur critique (P=0,05)	1,67	1,67	1,67
	$\mu_{(<2\mu m)} > \mu_{(2\text{-}10\mu m)}$	$\mu_{(2\text{-}10\mu m)} > \mu_{(>10\mu m)}$	$\mu_{(<2\mu m)} > \mu_{(>10\mu m)}$

IV.3.4. IMPORTANCE DE LA PRODUCTION BACTERIENNE ET DE LA DEMANDE BACTERIENNE EN CARBONE COMPAREES A LA PRODUCTION PRIMAIRE

Le rapport de la production bactérienne à la production primaire varie largement sur l'ensemble des stations (Figure IV.6). Il représente moins de 20 % sur 60 % des stations.

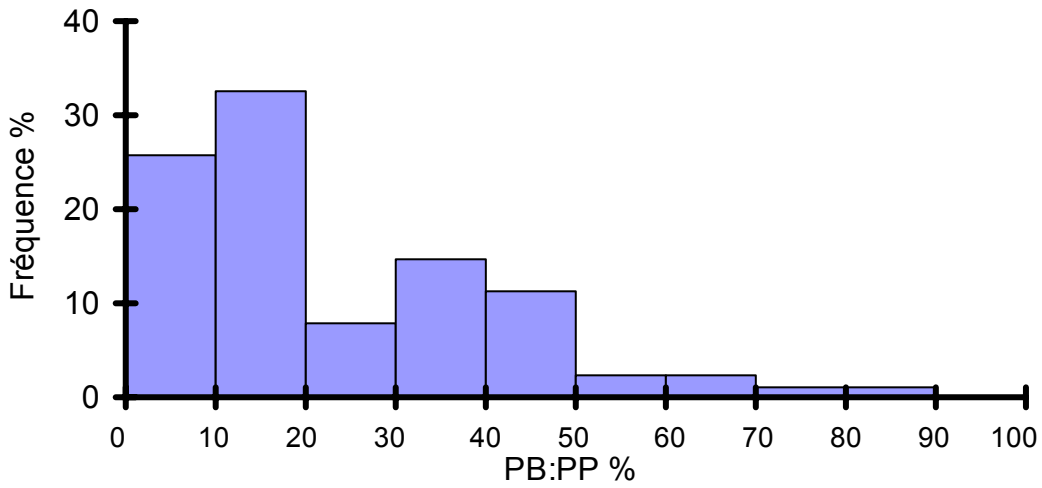


Figure IV.6 – Rapport entre la production bactérienne (PB) et la production primaire (PP). Une valeur supérieure à 100 % n'est pas représentée.

La corrélation entre production bactérienne et la production primaire est très hautement significative (r = 0,70, P<0,001, Figure IV.7). La pente étant significativement supérieure à 1, la production bactérienne augmente plus vite que la production primaire lorsque les trois saisons sont considérées de manière confondue (Tableau IV.9).

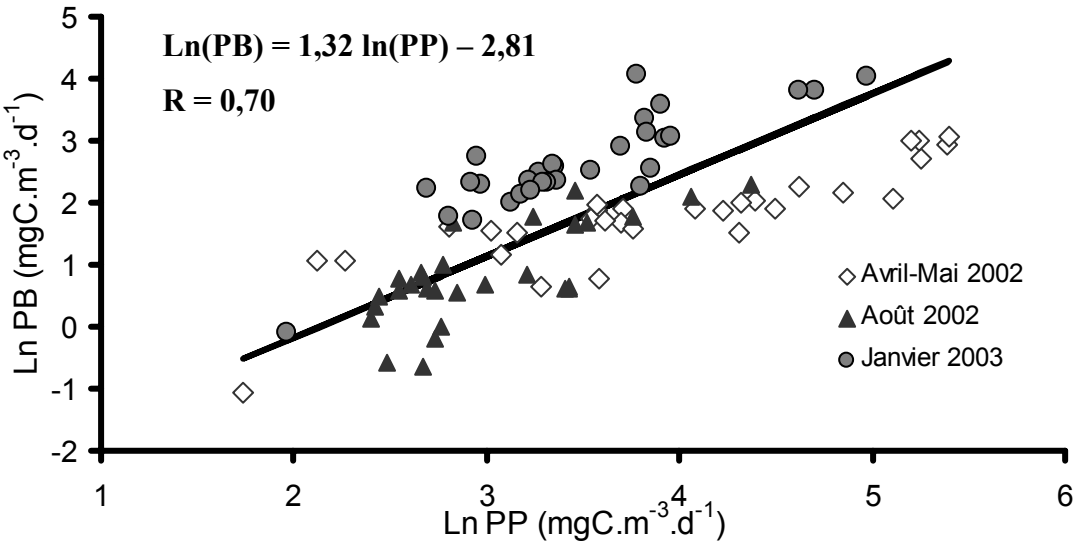


Figure IV.7 – Régression linéaire de modèle II entre Log Népériens de la production bactérienne et de la production primaire.

Tableau IV.9 - Régressions linéaire de modèle II entre les Log Népériens de la production bactérienne et de la production primaire.

	pente	intervalle de confiance à 95 % de la pente	ordonnée à l'origine	r
Ensemble des stations	1,32	1,13–1,54	- 2,81	0,70
Avril-mai 2002	0,82	0,68-1,01	-1,46	0,85
Août 2002	1,49	1,15-1,95	-3,65	0,74
Janvier 2003	1,32	1,09-1,60	-1,97	0,87

L'efficacité de croissance bactérienne (ECB), calculée à partir de la relation ECB vs. PB (Chapitre III, § III.5.2.6), varie entre 10 et 44 % le long des radiales étudiées.

En utilisant ces valeurs, la demande bactérienne en carbone (DBC=PB/ECB) est en moyenne 1,5 fois supérieure à la production primaire particulaire. En Avril-Mai et en Août, la demande bactérienne en carbone est pratiquement équivalente à la production primaire (1,03 ± 0,13 et 1,13 ± 0,09) ; alors qu'en Janvier la DBC est en moyenne 2,33 ± 0,14 fois supérieure à la PP. La corrélation entre la demande bactérienne en carbone et la production primaire est très hautement significative ($r = 0,69$, $p<0,001$, Figure IV.8). La pente n'étant pas significativement différente de 1, la demande bactérienne en carbone n'augmente pas plus vite que la production primaire, contrairement à ce qui est observé pour la production bactérienne (Tableau IV.10).

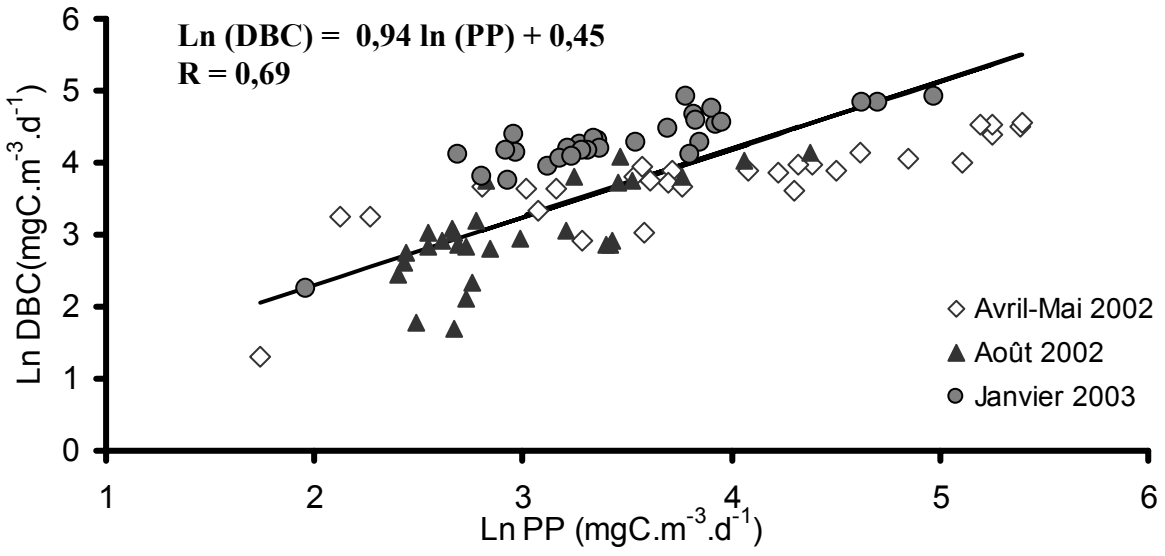


Figure IV.8 - Régression linéaire de modèle II entre Log Népériens de la demande bactérienne en carbone (DBC) et de la production primaire.

Tableau IV.10 - Régressions linéaire de modèle II entre les Log Népériens de la demande bactérienne en carbone et de la production primaire.

	pente	intervalle de confiance à 95 % de la pente	ordonnée à l'origine	r
Ensemble des stations	0,94	0,80 – 1,09	0,45	0,69
Avril-mai 2002	0,46	0,37 – 0,57	2,00	0,83
Août 2002	1,24	0,95 – 1,63	-0.70	0,72
Janvier 2003	0,56	0,45 – 0,70	2.34	0,83

IV.4. DISCUSSION

IV.4.1. GAMME DE CONDITIONS TROPHIQUES

Le premier objectif de cette étude était d'examiner si des gradients d'eutrophisation significatifs peuvent être observés aux 3 périodes clefs caractérisant l'évolution saisonnière des processus planctoniques dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie. Sur la plupart des radiales échantillonnées, il existe une relation entre la distance à la côte et les valeurs de biomasse phytoplanctonique et les activités planctoniques. La radiale lagonaire (Figure IV.1) fait exception et montre assez rarement des variations structurées des concentrations en nutriments, et des biomasses ou activités planctoniques. Cette radiale confirme la relative homogénéité des valeurs du chenal lagonaire comparée aux gradients rencontrés dans les baies. En station M41 située dans l'océan proche, les variables chimiques et biologiques sont significativement inférieures aux valeurs lagonaires.

Le choix des stations d'échantillonnage s'est fait dans le but de recouvrir la gamme la plus large possible de conditions trophiques. On observe effectivement des variations de près de 2 ordres de grandeur pour l'azote minéral dissous (facteur 84) et les phosphates (facteur 70). La concentration en chlorophylle *a,* généralement utilisée comme indicateur de l'état trophique du milieu (Van Duyl et al. 2002) varie d'un ordre de grandeur sur l'ensemble des données (0,11-1,42 $\mu g.l^{-1}$). La production primaire varie plus fortement, d'un facteur 40 au total. Enfin si la biomasse bactérienne ne montre que de faibles variations (x 2,7), la production bactérienne (normalisée par la même température) varie d'un facteur 165 ce qui montre de très larges variations des ressources disponibles pour la croissance bactérienne.

IV.4.2. LIMITATION NUTRITIVE

Le deuxième objectif de ce travail était d'évaluer quel est le macronutriment déterminant les réponses planctoniques aux apports. Outre les ressources nutritives, la salinité et la température peuvent être des facteurs déterminants de la biomasse et la production des premiers échelons trophiques des communautés planctoniques (Ducklow & Carlson 1992, Brush et al. 2002). La salinité varie peu le long d'une même radiale et présente des différences modestes entre les radiales échantillonnées à différentes périodes de l'année. La température, bien que peu variable le long d'une même radiale, montre des différences significatives au cours de l'année. Pour se soustraire des effets potentiels de la température sur la production bactérienne, les données ont été ramenées à une température de référence de 25°C en utilisant les relations

empiriques établies entre production bactérienne et température (cf. Chapitre II). La salinité et la température ne sont donc pas considérées comme des facteurs structurant les biomasses et activités planctoniques dans cette étude.

Les éléments nutritifs considérés comme potentiellement limitants sont l'azote, le phosphore et les silicates. Le contrôle éventuel par les micronutriments, tel que le fer, n'a pas été pris en compte car les sols de Nouvelle-Calédonie sont connus pour leur richesse en métaux (Latham 1981). Ainsi, les concentrations en fer dans le chenal des Loyauté sur la côte Est de la Nouvelle-Calédonie sont comprises entre 0,6 et 2 nM, et dépassent largement la concentration limitante de 0,13 nM reportée dans le Pacifique équatorial (Coale et al. 1996). Le lagon sud-ouest étant soumis à des apports terrigènes bien plus importants que le chenal des Loyauté, la limitation en fer semble donc hautement improbable dans cette zone d'étude.

Les concentrations et ratios en nutriments minéraux dissous (Si/N/P) suggèrent que le premier facteur potentiellement limitant est l'azote aux 3 périodes considérées. Ceci est en accord avec l'étude saisonnière en 2 stations du lagon SW (Chapitre III) montrant qu'à l'exception de quelques périodes ponctuelles, l'azote semble l'élément déterminant la production phytoplanctonique. Par ailleurs, les réponses des communautés à des enrichissements en N, P et C ont montré sans ambiguïté l'effet prédominant de l'azote (Novembre 2002, Août-Décembre 2003, données non publiées). Enfin, le temps de renouvellement du phosphate varie de 9 à 74 h (Torréton et al. *in prep*). Ces temps relativement longs, et en moyenne 9 fois plus élevés que les temps de renouvellement de l'ammonium, suggèrent donc que le phosphate ne limite pas les communautés planctoniques.

A l'opposé, les corrélations partielles entre variables biologiques et chimiques suggèrent que le phosphore est le facteur le plus déterminant dans l'enrichissement du milieu étudié. Ces relations statistiques ne sont donc pas en accord avec les autres méthodes de détermination. Un tel désaccord entre les relations statistiques *in situ,* meilleures avec les phosphates, et des ratios NID :PO_4 très faibles, suggérant au contraire un contrôle par l'azote a été observé dans le lagon de Suva, aux îles Fidji (Torréton et al. 2004). Ainsi, ces relations statistiques, qui n'expriment pas un lien de causalité, ne semblent pas adaptées dans ce type de milieu pour la détermination du nutriment limitant et peuvent parfois induire des erreurs d'interprétation.

L'utilisation des ratios des concentrations en nutriments pour la détermination du principal élément limitant la croissance bactérienne doit se faire avec plus de précaution que pour celle du phytoplancton. En effet, la composition élémentaire (C, N, P) des cellules, qui pose encore des questions pour le phytoplancton (Saňudo-Wilhelmy et al. 2004), semble encore plus incertaine

pour les bactéries. Alors que les bactéries ont été longtemps réputées pour présenter un C /N plus faible que celui du phytoplancton (Kirchman 1994 et références citées), les estimations les plus récentes de ce rapport C/N semblent ne pas le différencier de celui du phytoplancton (C/N = 6,8 ± 1,2 dans les assemblages bactériens côtiers, Fukuda et al. 1998). Le rapport C/P semble plus élevé (Kirchman 2000), toutefois celui-ci doit être utilisé avec prudence puisqu'il peut varier de manière importante suivant les conditions de croissance de 8 (Bratbak 1985) à 464 (Tezuka 1990).

Outre les nutriments inorganiques, les bactéries sont aussi capables d'utiliser la matière organique dissoute pour leur croissance. Dans cette étude, seule la matière organique totale a pu être déterminée. Sur l'ensemble des stations échantillonnées, le rapport NOT/POT est en moyenne de 43,7 ± 2,1. Les données du suivi saisonnier présentées dans le Chapitre précédent montrent qu'en moyenne la part de phosphore organique particulaire dans le phosphore organique total est de 62 ± 5 %, et celle d'azote organique particulaire de 34 ± 3 %. Si ces contributions restent approximativement respectées le long des radiales étudiées, le rapport NOD/POD pourrait être plus élevé que celui de la matière organique totale. Ce rapport est donc *a fortiori* en moyenne plus élevé que le rapport NID/PID de 4,09 ± 0,4. Ainsi, si l'on se base sur les ratios des concentrations en matière organique, les bactéries pourraient être limitées par le phosphore avant de l'être par l'azote.

Ceci suggère donc la nécessité d'utiliser plusieurs méthodes pour déterminer le premier élément limitant la croissance phytoplanctonique et bactérienne et implique de ne pas se baser seulement sur les relations statistiques entre nutriments et variables biologiques.

IV.4.3. REPONSES DES COMMUNAUTES BACTERIENNE ET PHYTOPLANCTONIQUE AUX ACCROISSEMENTS LOCAUX EN RESSOURCES NUTRITIVES

La biomasse phytoplanctonique et la production primaire montrent une corrélation positive avec l'ensemble des nutriments quelle que soit la période considérée. Le taux de croissance phytoplanctonique est positivement corrélé avec les nutriments lorsque l'ensemble des radiales est pris en compte. Pourtant, le traitement par saison indique qu'il n'y a aucune relation significative entre le taux de croissance phytoplanctonique et les nutriments excepté en Avril-Mai 2002 avec les phosphates et les silicates. Cette absence de relation, alors que la biomasse phytoplanctonique augmente, suggère un faible contrôle descendant sur les organismes phytoplanctoniques.

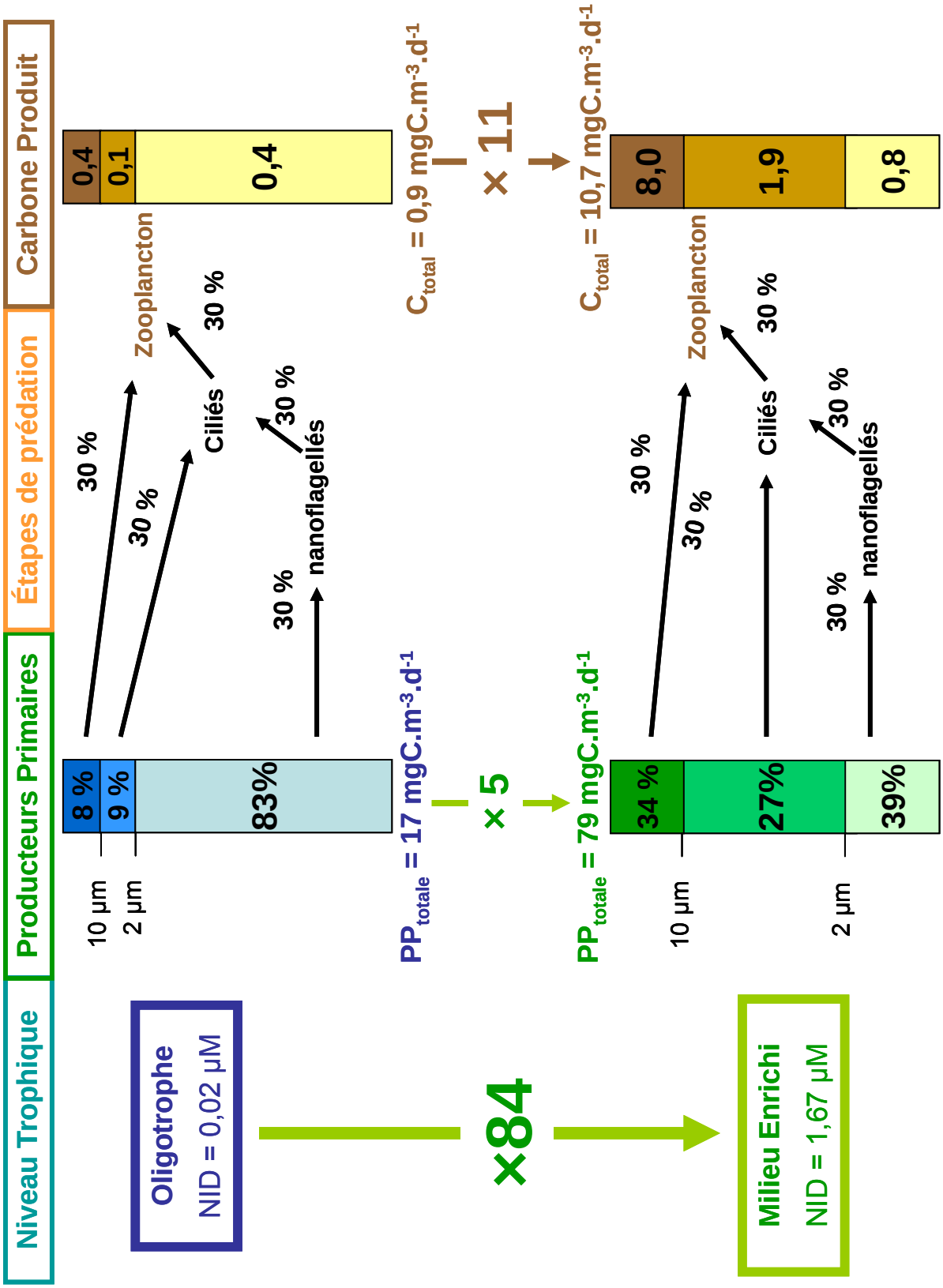


Figure IV.9 - Flux de carbone estimés dans deux situations trophiques contrastées du lagon SW. La production primaire totale et sa distribution en classes de taille sont les valeurs mesurées « in situ ». On admet un rendement de 30 % pour le carbone à chaque étape de prédation.

L'étude des classes de taille phytoplanctonique montre une diminution de la contribution de la fraction <2 µm et une augmentation de la contribution de la fraction entre 2 et 10 µm. Ce phénomène est en accord avec les dénombrements du phytoplancton montrant une décroissance importante du rapport picophytoplancton/nanophytoplancton pour des concentrations croissantes en nutriments (Chapitre V). Ces modifications de la taille du phytoplancton suggèrent, soit un contrôle faible de la fraction entre 2 et 10 µm par les prédateurs, soit un taux de croissance bien supérieur à celui de la communauté < 2 µm. Un test d'égalité des espérances sur le rapport PP/Chl.*a* (indicateur du taux de croissance du phytoplancton en admettant que le rapport carbone/Chl.*a* du phytoplancton est identique dans chaque classe de taille) montre qu'il est, en fait en moyenne, 1,6±0,1 fois inférieur dans la fraction 2-10 µm comparé à la fraction < 2µm. Ceci suggère que la fraction comprise entre 2 et 10 µm ne devient pas dominante en raison d'un taux de croissance plus élevé. L'hypothèse la plus vraisemblable est donc celle d'un contrôle par la prédation moins sévère que celui s'exerçant sur les plus petites tailles, et non d'un avantage compétitif.

Ces changements de tailles peuvent avoir des conséquences importantes en terme de flux vers les organismes supérieurs dans la mesure où les prédateurs de chacune des ces classes de taille sont différents. En se basant sur le schéma simplifié du réseau trophique microbien (Chapitre I) et en supposant que (1) le phytoplancton > 10 µm est directement consommé par le zooplancton, (2) le phytoplancton de 2 à 10 µm est consommé par les ciliés, eux-mêmes consommés par le zooplancton, et (3) le picophytoplancton (<2 µm) n'est consommé que par les nanoflagellés, eux-mêmes consommés par les ciliés puis par le zooplancton, il est possible de schématiser les flux de la production primaire vers le mesozooplancton aux 2 extrêmes des situations trophiques rencontrées dans cette étude, en admettant un rendement de transfert de carbone de 30% à chaque étape de prédation (Figure IV.9).

Ainsi, pour une concentration en azote minéral dissous 84 fois plus importante, la production primaire particulaire totale augmente d'un facteur 5. Toutefois, cette production est réalisée à 9 % par du nanophytoplancton et 8 % par le microphytoplancton au site le plus pauvre et, respectivement, à 27 % et 34 % en situation plus eutrophe. En raison du nombre d'étapes de prédations plus important pour les classes de tailles les plus petites, le carbone produit par les niveaux supérieurs du réseau trophique sera plus important (un facteur 11 ici, pour le microzooplancton) que ne le laisse supposer la production primaire totale.

Bien que les relations au sein des communautés phytoplanctoniques soient sûrement beaucoup plus complexes que celles représentées ici, ce schéma montre l'importance de tenir

compte des classes de taille phytoplanctoniques pour évaluer les conséquences trophiques des apports nutritifs au milieu lagonaire. Les spectres de taille ne sont pas seuls en jeu dans ces transferts vers les niveaux supérieurs, et la composition des peuplements y joue vraisemblablement un rôle. Le Chapitre V de ce manuscrit aborde de manière plus détaillée les changements au sein des communautés phytoplanctonique en fonction des conditions trophiques.

IV.4.4. PRODUCTION BACTERIENNE VS. PRODUCTION PRIMAIRE

Le dernier objectif de cette étude était de comparer l'évolution de la production bactérienne par rapport à la production primaire en réponse aux gradients nutritifs et en particulier d'examiner si les rapports PB/PP et BCD/PP évoluent avec le degré d'enrichissement. Le ratio moyen entre la production bactérienne et la production primaire est de 23 %. Ce rapport PB/PP est faible aux stations les plus pauvres et du même ordre de grandeur que le ratio (18 %) obtenu dans le gyre oligotrophe près des Bermudes (Ducklow 1999).

Lorsque l'on considère l'ensemble des stations, la production bactérienne augmente significativement plus que la production primaire aux stations les plus riches. Par contre, lorsque l'on étudie les relations par saison, ceci ne se vérifie pas pour les radiales d'Avril-Mai 2002. Ainsi, la relation globale masque cette particularité. Ceci montre soit que les bactéries n'ont pas un rôle égal au cours de l'année sur l'eutrophisation, soit que l'utilisation des relations ne permet pas à elle seule de déterminer les liens entre le compartiment phytoplanctonique et bactérien. Les bactéries auraient un rôle d'aggravation de l'eutrophisation à deux périodes de l'année dans nos conditions d'études. La relation en Avril-Mai ne permet pas de mettre en évidence un effet direct des apports extérieurs sur l'activité bactérienne.

La demande bactérienne en carbone, déduite de l'ECB, n'augmente pas aussi vite que la production bactérienne en fonction de la production primaire particulaire. En moyenne, sur l'ensemble des radiales, la DBC est faiblement supérieure à la production primaire. La seule particularité se situe en Janvier 2003 où la DBC est, en moyenne, 2,3 fois supérieure à la production primaire. La production primaire dissoute n'a pas été mesurée au cours de cette étude. L'exsudation phytoplanctonique est une des sources possibles de substrat organique pour les bactéries (Ducklow & Carlson 1992). Cette source de substrat organique est même parfois considérée comme la plus importante soutenant la production bactérienne (Cole et al. 1988, Conan et al. 1999). Une idée généralement admise est que l'exsudation phytoplanctonique semble d'autant plus importante que le milieu reçoit une énergie importante et est pauvre en nutriment (Obernosterer & Herndl 1995, Moran & Estrada 2002, Moran et al. 2002).

L'irradiance journalière est maximale en Janvier (Chapitre III, § III.3.3) et en moyenne, les concentrations en nutriments y sont plus faibles qu'aux autres périodes. Ce rapport DBC/PP plus élevé en janvier pourrait ainsi en partie être expliqué par une production primaire dissoute plus importante à cette période caractérisée par un minimum des concentrations en nutriments.

L'efficacité de croissance bactérienne (ECB) a été estimée à l'aide d'une relation (modèle de Del Giorgio & Cole 1998) établie dans ce même milieu entre ECB et production bactérienne (Briand et al. 2004 et données non publiées). En appliquant cette relation aux productions bactériennes mesurées le long des radiales, l'ECB varie entre 10 et 45 %. Il faut toutefois garder à l'esprit que le pouvoir prédictif de telles relations reste faible. Si l'on tient compte de l'intervalle de confiance de cette relation, la valeur moyenne globale de 15,5 ± 0,7% varie entre 6,2 ± 0,3 % et 24,8 ± 1,2 %, soit d'un facteur 4. L'échelle de variation de l'efficacité de croissance met en évidence la difficulté de l'étude des flux entre compartiment bactérien et phytoplanctonique. Le ratio DBC/PP déduit de l'ECB varie alors en moyenne (±SE) entre 0,9 ± 0,1 et 3,8 ± 0,2.

Ainsi, que nous l'avons vu ci-dessus, ce ratio ne tient pas compte de la production primaire dissoute. Sa proportion par rapport à la production primaire particulaire est généralement considérée comme supérieure en conditions oligotrophes (Obernosterer & Herndl 1995, Moran & Estrada 2002, Moran et al. 2002), mais récemment Maraňón et al. (2004) ont montré que l'exsudation phytoplanctonique serait plutôt un processus physiologique passif indépendant des conditions trophiques. Les premières mesures de la production primaire dissoute dans le lagon sud-ouest indiquent qu'elle peut parfois atteindre jusqu'à 60 % de la production primaire particulaire (Rochelle-Newall, non publié). Les prochaines études auront donc pour nécessité d'estimer la production primaire dissoute dans le lagon sud-ouest afin d'améliorer la compréhension des flux entre compartiments bactériens et phytoplanctoniques.

Par ailleurs, la comparaison de la demande en carbone des producteurs secondaires avec la production primaire peut constituer un piège, comme expliqué par Strayer (1988) et confirmé par Scavia (1988). Du fait que le même carbone peut contribuer à la production de plusieurs compartiments, et ce à plusieurs reprises, il est comptabilisé plusieurs fois. La somme des demandes en carbone des producteurs secondaires peut donc être supérieure à la seule production primaire. Ce recyclage peut conduire à observer une demande bactérienne en carbone légèrement supérieure à la production primaire sans qu'il soit nécessaire d'invoquer des apports allochtones pour combler cette différence.

IV.5. CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons montré que des gradients nutritifs et biologiques persistaient aux 3 périodes clefs étudiées.

Sur la base des concentrations et ratios en nutriments, l'azote semble être le macronutriment déterminant les biomasses et production phytoplanctoniques aux 3 périodes étudiées, en accord avec ce qui a été montré au cours du suivi saisonnier en 2 stations. Ce rôle clef de l'azote est par ailleurs en accord avec des bioessais effectués ponctuellement dans ce milieu et avec le turnover beaucoup plus rapide de l'azote ammoniacal comparé à celui du phosphore. Par contre, l'utilisation des relations statistiques entre les variables planctoniques et les nutriments minéraux dissous est en désaccord avec les approches précédentes et l'interprétation de telles relations est donc à considérer avec précaution.

Cette étude permet de mettre en évidence, quelles que soient les périodes de l'année, une augmentation nette de la biomasse chlorophyllienne et des productions planctoniques en relation avec les apports en nutriments. Ces changements s'accompagnent d'une augmentation de la taille des cellules phytoplanctoniques, qui peut avoir des conséquences potentielles non négligeables sur les flux vers les échelons trophiques supérieurs. Cette modification des flux entre compartiments planctoniques est aussi mise en évidence par l'étude des relations entre production bactérienne et production primaire. Sur l'ensemble des données, la production bactérienne augmente proportionnellement plus que la production primaire en réponse aux enrichissements. Il est difficile de montrer que la demande bactérienne excède la production primaire, même aux sites les plus enrichis, en raison de l'incertitude de la relation entre ECB et PB. Toutefois, la tendance précédente et l'importance de la demande bactérienne en carbone par rapport à la production primaire particulaire suggèrent que la production bactérienne repose pour partie sur les apports allochtones aux sites les plus eutrophisés. En utilisant les apports allochtones de matière organique, les bactéries intègrent une part de cette matière organique au réseau trophique, accroissant le phénomène d'eutrophisation.

CHAPITRE V

Réponses des communautés phytplanctoniques à des apports en nutriments croissants

CHAPITRE V. REPONSES DES COMMUNAUTES PHYTOPLANCTONIQUES AUX APPORTS EN NUTRIMENTS

Responses of the phytoplankton communities to increased anthropogenic influences (Southwestern Lagoon, New Caledonia)[9]

Séverine JACQUET, Bruno DELESALLE, Jean-Pascal TORRETON, Jean BLANCHOT

V.1. RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

L'effet des changements *in situ* des concentrations en nutriment sur la biomasse et la composition des communautés phytoplanctoniques a été étudié à partir de données obtenues lors de 8 campagnes réalisées à différentes saisons sur le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Le lagon est caractérisé par des variations spatiales des concentrations en macronutriments avec des valeurs relativement élevées dans les baies autour de la ville de Nouméa. Les rapports Si/DIN/DIP suggèrent que l'azote est le macronutriment qui contrôle la composition des communautés phytoplanctoniques.

L'abondance de la plupart des groupes microphytoplanctoniques dénombrés par microscopie inverse et des groupes picophytoplanctoniques distingués par cytométrie en flux montre des relations distinctes et significatives avec les concentrations en azote inorganique. Ainsi, bien que modérés, les accroissements locaux en azote, entraînent une augmentation de la biomasse phytoplanctonique, accompagnée de changements significatifs de la structure des communautés. Ces modifications ne se limitent pas à un simple accroissement de la taille moyenne phytoplanctonique avec les concentrations croissantes en nutriments.

La communauté picophytoplanctonique, dominée par les *Prochlorococcus* dans l'océan proche et les sites situés dans la partie sud du lagon, est dominée par les *Synechococcus* dans les baies, avec une proportion croissante de picophytoplancton eucaryote. Concernant le microphytoplancton, les enrichissements en nutriments dans les baies favorisent les grosses diatomées au détriment des coccolithophoridés et des dinoflagellés qui dominent plutôt dans l'océan proche et dans les eaux du lagon sud.

---

[9] Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication, actuellement en révision pour Marine Ecology - Progress Series

V.2. INTRODUCTION

The influence of macronutrients (N, P, Si) availability on phytoplankton species composition is well established in temperate waters (e.g. Collos et al. 1997, Olsen et al. 2001, Berg et al. 2003, Lee Chen et al. 2004) whereas oligotrophic tropical waters have received far less attention (DiTullio et al. 1993, Sakka et al. 1999, Van Duyl et al. 2002, Tada et al. 2003).

In tropical waters, coral reefs have often been considered as mainly benthic ecosystems where planktonic processes were negligible (Lewis 1977, Hatcher 1996, Gattuso et al. 1996). Due to this relative lack of interest, planktonic studies in coral reef waters mainly focused either on total phytoplankton biomass (*e.g.* Delesalle & Sournia 1992, Leborgne et al. 1997), growth rate (Furnas 1991), or picophytoplankton biomass (*e.g.* Charpy & Blanchot 1999). Only a few studies have taken into account the detailed phytoplankton composition, either in French Polynesia (Delesalle et al. 1993, Dufour & Berland 1999, Sakka et al. 1999, Delesalle et al. 2001), on the Great Barrier Reef (Revelante & Gilmartin 1982, Furnas & Mitchell 1986) or in the Caribbean (Van Duyl et al. 2002). Moreover, in most of the above studies the relationships between nutrient concentrations and the phytoplankton community structure were not taken into account, except by Sakka et al. (1999) in Takapoto Atoll (French Polynesia) and by Van Duyl et al. (2002) in the Caribbean.

Coral reefs lagoons, as many coastal waters, are subjected to increased nutrient loads related to human activities (Gast et al. 1999, Van Duyl et al. 2002). Indeed, changes in nutrient concentrations are known to have 'cascade effects' on the composition of the phytoplankton community in temperate (Margalef 1978) and tropical (Furnas 1991) waters. These changes in the phytoplankton community structure in turn affect the nutrient cycling (Sakka et al. 2002) and the structure of the other compartments of the food web, either in temperate or in tropical waters (Goldman et al. 1985, Niquil et al. 1999, Olsen et al. 2001). Due to their oligotrophic status, increased nutrient concentrations are expected to have stronger consequences on phytoplankton communities in coral reef waters than in meso- to eutrophic temperate waters. However, the influence of increased nutrient load of human origin on phytoplankton community structure in tropical waters has only been documented in the study of Van Duyl et al. (2002) in the Caribbean.

Furthermore, changes in the structure of phytoplankton communities are known to be involved in the increased frequency of phytoplankton blooms during the last decade in temperate waters (Smayda 1989), with often severe consequences on aquatic resources (Paerl 1997, Turner

& Tester 1997, Zingone & Oksfeldt-Enevoldsen 2000) or human health (Boesch et al. 1997, Anderson et al. 2002, Smith 2003). Planktonic harmful algal blooms in coral reef waters sometimes occur but were seldom documented (Guzman et al 1990). Therefore, the consequences of an increased nutrient load of human origin on the phytoplankton community structure needs to be considered in various coral reef environments of different trophic status in order to prevent harmful blooms.

The aim of our study was to investigate the effects of local changes in nutrient concentrations induced by human activities on the phytoplankton biomass and composition in the South-Western (SW) lagoon of New Caledonia. While several studies have been conducted on the physical environment (*e.g.* Douillet 1998, Douillet et al. 2001) and on benthic communities (*e.g.* Boucher et al. 1994), very little is known about phytoplankton biomass (Rougerie 1985) and phytoplankton composition in the lagoon (Cardinal 1983) and in surrounding oceanic waters (Desrosières 1975). In the 2,000 km^2 SW lagoon, several trophic gradients exist between the more or less anthropized coastal regions and the oligotrophic ocean. Locally elevated nutrient concentrations observed in the coastal areas around the conurbation of the city of Nouméa are due to urban sewage, industrial or agricultural wastes.

We studied the relationships between the macronutrient concentrations and the phytoplankton, firstly considering the global estimates of phytoplankton abundance, *i.e.* total and size fractionated chlorophyll *a*, in order to allow comparisons with existing studies in coral reefs waters. In addition, we focused on the still largely unknown composition of the phytoplankton community, namely the pico- and microphytoplankton, determined by cytometric and microscopic analyses respectively, and its relationships with macronutrient concentrations.

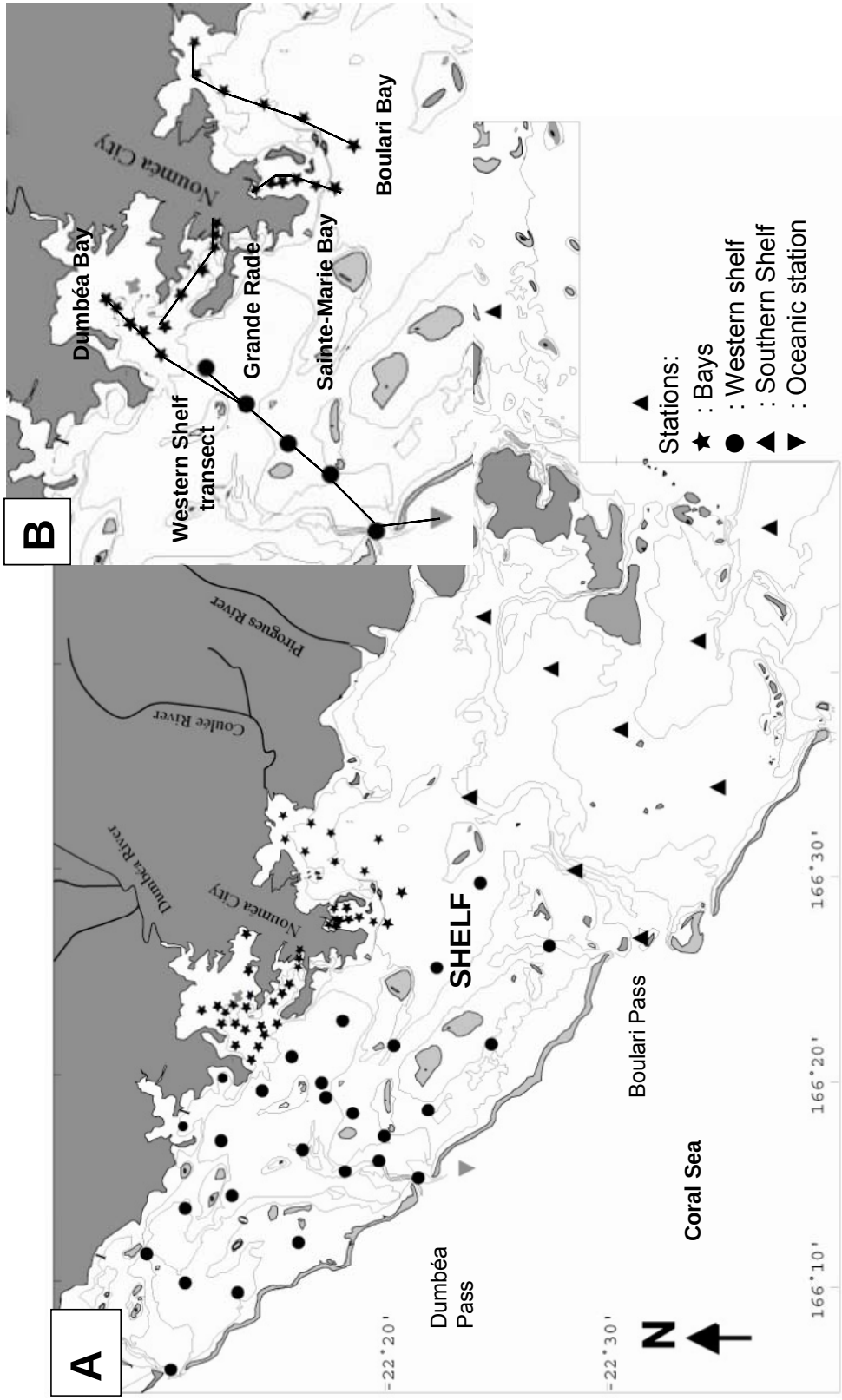


Figure V.1 - (A) Map of the southwestern lagoon indicating sampling locations. Each group of stations is represented by a different symbol. Insert B shows stations sampled around Nouméa. Sainte-Marie Bay receives urban waste waters. Grande Rade collects urban waste waters and industrial effluents from the nickel industry. Dumbéa and Boulari Bays are under terrigeneous influence.

V.3. MATERIAL AND METHODS

V.3.1. STUDY AREA

The south-western lagoon of New Caledonia covers approximately 2,066 km^2 with a mean depth of 17.5 m (Figure V.1). Coral reefs only cover 5% of this area, the remaining being constituted by white reef sands (15 %), grey sands (50 %) and mud deposits (30 %) (Clavier & Garrigue 1999). Three deep passes (60 m depth) bisect the barrier reef. Freshwater inputs are mainly provided by the Dumbéa, Boulari and Pirogues Rivers. The dominant south-eastern trade winds govern the direction of the surface currents (Douillet et al. 2001). Oligotrophic oceanic waters enter the lagoon through the open southern shelf, are driven in the study area by the trade winds and then exit by the passes on the western shelf. Therefore, the shelf was divided in its western and southern sectors, the latter being generally the most oligotrophic area as it is remote from the terrigeneous and anthropogenic influences.

The area of the lagoon studied includes the city of Nouméa, with a population of 132 000 inhabitants (60 % of the total population of New Caledonia). Around Nouméa, four bays, which differ in terms of their predominant human activities, were examined (Figure V.1). The Sainte-Marie Bay receives urban waste waters from the Sainte-Marie area. The Grande Rade Bay is also influenced by urban effluents, but, in addition, receives the industrial effluents originating from the nickel industry. In contrast, the bays of Dumbéa and Boulari are under the terrigeneous influence from the Dumbéa and Pirogues River, respectively. In addition, an oceanic station located 2 miles offshore of the Dumbéa Pass was sampled (Figure V.1). Thus, the investigated stations were arranged in 6 groups: Southern Shelf, Western Shelf, Sainte-Marie Bay, Grande Rade Bay, Dumbea Bay, and Boulari Bay with oceanic station beeing analyzed separately.

V.3.2. SAMPLING

Water samples were collected during 8 field trips which took place during different seasons between November 1999 and January 2003 (Table V.1). A small speed boat was used for all field trips except that of September 2000 during which work was done on 71 stations distributed along the whole SW lagoon and conducted onboard the Alis Research Vessel (Figure V.1A). In each bay and in the western shelf, a transect of 6 stations, arranged along a trophic gradient, were sampled (Figure V.1B). Water samples were collected using acid washed 5-l Niskin bottles at 3-m depth in order to prevent contamination by occasional freshwater inputs following raining events. Previous work has shown that 3-m deep samples are on average well representative of

the whole water column (Jacquet et al. in prep). Samples were either immediately processed onboard (September 2000) or kept in Niskin bottles until return to the laboratory within 1h30. Conductivity, temperature, *in vivo* fluorescence and turbidity profiles were simultaneously recorded using a SeaBird SBE 19 profiler and Seapoint Fluorometer and Turbidity Meter, respectively.

Table V.1 - Sampling period, number of stations sampled, and corresponding season. A transect is a set of 6 stations located from the coast to the open sea (Figure V.1B).

Period	Number of stations	Site	Season
November 1999	19	5 transects (1 in each of the 4 bays and 1 the western shelf)	dry
September 2000	71	Western and southern shelves, oceanic station and bays	dry
November 2000	9	Western Shelf	dry
March-April 2001	85	5 transects (1 in each of the 4 bays and 1 the western shelf), 3 times	transition
July 2001	21	4 transects (except Boulari Bay)	cold
April 2002	30	5 transects (1 in each of the 4 bays and 1 the western shelf)	transition
August 2002	30	5 transects (1 in each of the 4 bays and 1 the western shelf)	cold
January 2003	30	5 transects (1 in each of the 4 bays and 1 the western shelf)	cyclonic

V.3.3. NUTRIENT ANALYSES

Ammonium concentration was fluorometrically determined on three unfiltered 40 ml replicates on a Turner TD-700, using the *o*-phtaldialdehyde method (Holmes et al. 1999) immediately after collection. This procedure gave a coefficient of variation (CV) between replicates ranging from 5 (eutrophic) to 30% (oligotrophic waters).

Unfiltered replicate 40 ml samples were immediately frozen pending nitrate + nitrite (NO_3+NO_2), and phosphate (PO_4) analyses. Nitrates were reduced to nitrites according to Wood et al. (1967), and NO_3+NO_2 concentrations were determined according to Raimbault et al. (1990) on a Bran+Luebbe Autoanalyzer III with an averaged CV of 3 to 8%. Phosphate concentrations

were determined according to Grasshoff et al. (1983) on a Bran+Luebbe Autoanalyzer III with an averaged CV of 6 to 11%. Silicates were determined on one 60 ml subsample that was immediately frozen after sampling. Total silicates (*i.e.* dissolved and colloidal) were measured following the Koroleff (1983)'s protocol.

V.3.4. PHYTOPLANKTON ABUNDANCE AND COMPOSITION

Chlorophyll *a* (Chl.*a*) concentration was fluorometrically determined on methanol extracts of replicate 300 ml samples filtered onto Whatman GF/F filters according to Holm-Hansen et al. (1965). The size fractionated Chl.*a* concentrations were also determined on 90 replicate 300 or 500 ml samples, using 2 µm and 10 µm Nuclepore membranes. These samples were collected during the field trips of April 2002, August 2002 and January 2003.

Picophytoplankton, *i.e. Prochlorococcus*, *Synechococcus,* and picoeukaryotes, were enumerated by flow cytometry on 205 samples collected during the field trips of November 1999 to July 2001. Water samples (1.5 ml) were preserved with 7.5 µl glutaraldehyde (Sigma Grade II) at room temperature in the dark for 15 min before storage in liquid nitrogen pending analysis. Enumeration of picophytoplankton populations was conducted according to Blanchot & Rodier (1996) on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488nm and with a standard filter setup. Yellow fluoresbrite 0.95 µm beads were used as internal standards (size and fluorescence). The count rates per second never exceeded 500 optical events in order to avoid underestimation of particle abundance. Picophytoplankton data were gathered from samples glutaraldehyde preserved and stored in liquid nitrogen, it is therefore not possible to estimate individual dimensions from FSC which needs in vivo samples. However, Charpy & Blanchot (1998) estimated that *Prochlorococcus, Synechococcus and* picoeukaryotic algae presented spherical equivalent diameters averaging 0.62 µm, 0.89 µm, and 3.11 µm, respectively in a Tuamotu atoll lagoon. Picoplankton biovolumes were computed using the same dimensions.

The abundance and biovolume of microalgae were estimated using the inverted microscopy on a selection of the 135 samples collected during the field trips. Water samples (250 ml) were preserved in the dark with neutral formalin (2.5 %, final concentration). Cells counts were achieved using the classical Utermöhl method (Utermöhl 1958) with an inverted microscope (Wild M40). Counting was done at a magnification of 300 X. Higher magnification (1500 X) was used for the identification of minute species. The inverted microscope usually does not allow the identification of most of the phytoplankton species, particularly the smallest specimens

(*e.g.* coccolithophorids). In this study, phytoplankton was always identified at the class level, whereas the identification at the genus or species level was achieved whenever possible. Microalgal biovolumes were calculated using the standardized set of equations proposed by Hillebrand et al. (1999). The linear dimensions used for calculation were obtained either from microscopy measurements or from the literature (*e.g.* Tomas 1996). For each taxon, a unique mean volume was then applied to all samples in which this taxon was encountered.

V.3.5. STATISTICAL TESTS

One-Way ANOVA was used to compare nutrients and phytoplankton average data between the 7 areas of the SW lagoon. Data were normalized using log (x+1) transformation. When the ANOVA test showed significant effects, an LSD (Least Significant Difference) *a posteriori* Fisher's t-test was applied on paired groups of stations. Spearman rank correlation coefficients were used in order to characterize the gradients of nutrient concentrations along the stations of the transects (Figure V.1B). The correlation coefficients were tested by *a posteriori* Bonferroni test. Model II regression (Sokal & Rohlf 1995) was used on log transformed data in order to analyze the relationships between nutrients concentrations and phytoplankton characteristics (*i.e.* total and size-fractionated Chl.*a* concentrations, and pico- and microphytoplankton abundances). Regarding the microalgae, the limited precision of counts was circumvented by grouping algal abundances in a limited number of classes. All regression analyses of phytoplankton variables *vs.* nutrient were performed on average values computed in 12 logarithmic classes of nutrient concentrations. The classes containing only one value were not considered in the regression analysis.

V.4. RESULTS

V.4.1. PHYSICAL CHARACTERISTICS

Temperature and salinity did not differ significantly along transects (data not shown). Water temperature ranged between 20.7°C (August 2002) and 28.8 °C (January 2003) whereas salinity was generally (83 % of the values) between 34.5 and 35.5.

V.4.2. NUTRIENTS

Average nutrient concentrations for the 7 sites are shown in Figure V.2. The ANOVA analyses (Figure V.2) showed that DIN (~0.15 µM) did not differ significantly between the ocean, the southern and western shelves, and Boulari Bay. DIN concentrations were significantly more elevated in the other bays, Sainte-Marie Bay being the most enriched (~0.95 µM).

Regarding phosphorus, Sainte-Marie Bay presented DIP concentrations (0.12 µM) significantly higher than all the other sites, whereas Grande-Rade Bay (0.06 µM) displayed DIP concentrations greater than Boulari Bay (0.03 µM) and the western shelf (0.04 µM). Si concentration was significantly lower in the ocean or southern shelf (~1.04 µM) than in the western shelf (1.95 µM) and was significantly higher in the bays (2.5-5 µM) than in adjacent ocean and in western and southern shelves.

Along transects, all nutrients showed significant gradients in Sainte-Marie and Grande Rade bays, *i.e.* the bays located in the urbanized area (Table V.2). On the contrary, no significant gradients were detected for DIN and DIP in the non urbanized Dumbéa, Boulari bays and in the Western Shelf transect. Significant gradients in silicates were observed within all the transects.
Mean DIN:DIP ratio was 5.4 ± 0.9 (± SE, n = 241) for all samples. Low DIN and high Si concentrations resulted in high Si:DIN ratios (mean ±SE: 23.3 ± 2.1, n=285). In general, there were no significant gradients in nutrient ratios within the bays. The only exceptions were the Grande Rade Bay (Si:DIN) and Boulari Bay (NH_4^+:DIN).

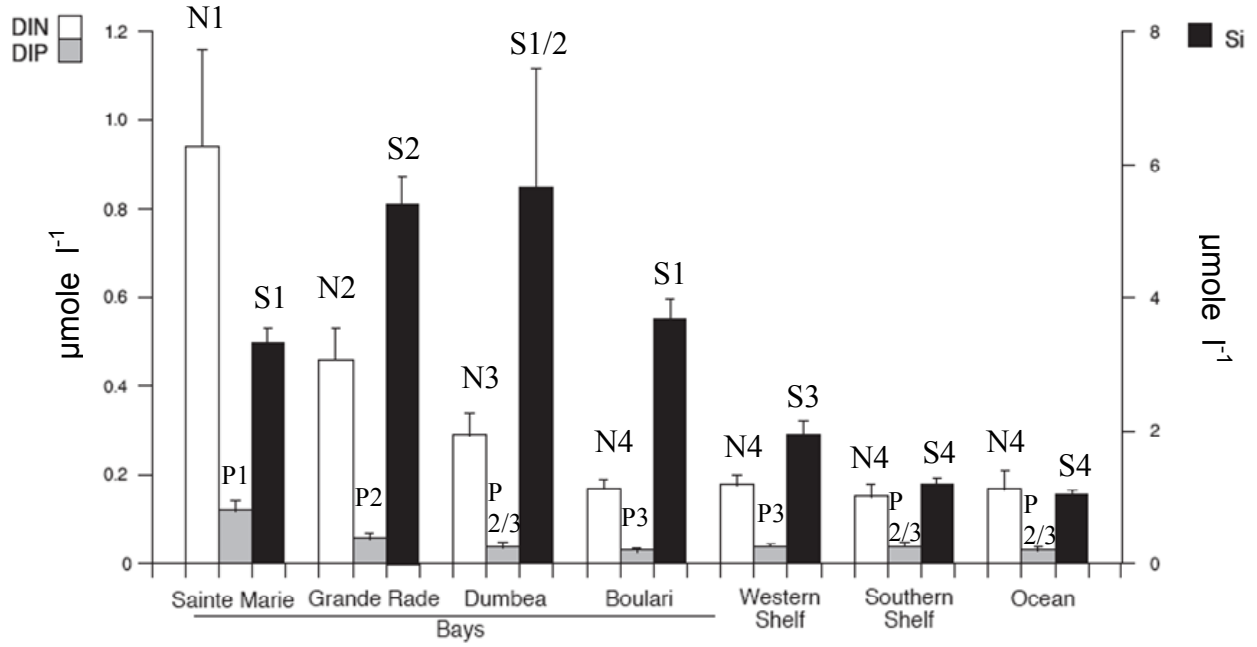


Figure V.2 - Average nutrient concentrations for the different areas of the SW Lagoon. DIN, DIP: Dissolved Inorganic Nitrogen and Phosphorus, Si: silicates. Bars represent standard errors. Same letters indicate that averages are significantly equal (ANOVA, p<0.01).

Table V.2 - Spearman's rank correlations (n) between data and station numbers. Only stations of transects presented in Figure V.1B are used. Stations are numbered 1 to 6 from coast to open lagoon at each transect (from coast to the ocean for the 'lagoon transect'). Negative values represent decreasing variables from coast to open lagoon. Correlations are calculated from all data and not from averages from Table V.2. **: P < 0.01, *: P < 0.05, otherwise not significant. Chl.*a :* Chlorophyll *a*.; DIP : Dissolved Inorganic Phosphorus; Si: silicate; NH_4 : Ammonium; DIN: Dissolved Inorganic Nitrogen (NH_4 + NO_3 + NO_2).

	DIN	DIP	Si	DIN:DIP	NH_4:DIN	Si:DIN	Chl.*a*
Sainte-Marie Bay	-0.64 ** (45)	-0.57 ** (50)	-0.30 ** (50)				-0.56** (50)
Grande Rade Bay	-0.69 ** (46)	-0.62 ** (46)	-0.65 ** (46)			0.31 * (46)	-0.67 ** (46)
Dumbéa Bay			-0.61 ** (54)				-0.71 ** (54)
Boulari Bay			-0.44 ** (38)		0.44* (33)		-0.52 ** (40)
Western Shelf Transect			-0.43 ** (45)				-0.46 ** (45)

V.4.3. PHYTOPLANKTON

The total chlorophyll *a* (Chl.*a*) concentrations ranged from 0.1 to 2.4 µg l^{-1}. It did not differ between the ocean and the shelf but significantly increased in the bays (Figure V.3). The Chl.*a* concentrations were significantly higher in Grande Rade and Sainte-Marie bays than in Boulari and Dumbéa Bays and coast-to-lagoon transects showed significant gradients within each bay (Table V.2).

The maximum contribution (88 %) of the <2 µm fraction was observed in the ocean whereas the maximum contribution (74 %) of >10 µm fraction was observed at the inner station of Grande Rade (D01). The contribution of the >2 and 2-10 µm fractions, less important than the fraction <2 µm in the ocean and southern shelf, became as important as the <2 µm fraction in the Grande Rade and Sainte-Marie bays (Figure V.3).

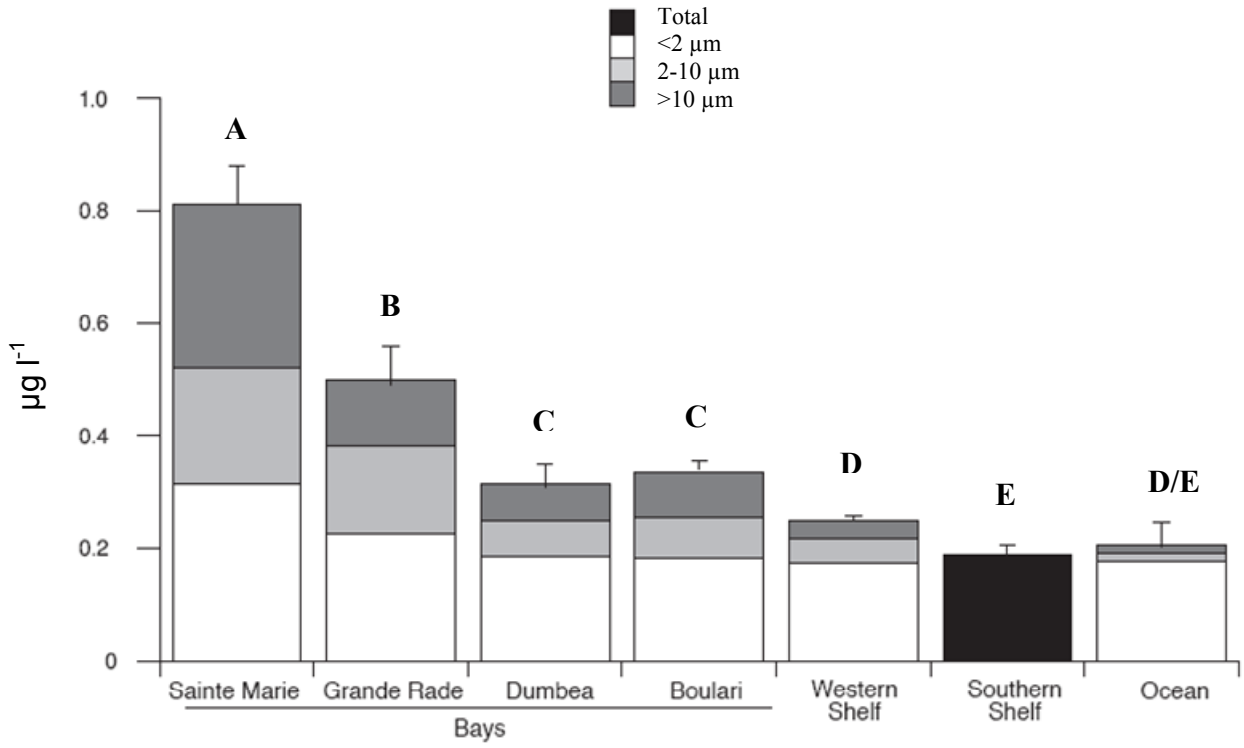


Figure V.3 - Average Chlorophyll *a* (µg l^{-1}) for the different areas of the SW lagoon of New Caledonia. Chl. *a* concentrations always increase in the bays close to the coast. Bars represent standard errors of the total Chl. *a* concentration. Same letters indicate that averages of total Chl. *a* concentration are significantly equal (ANOVA, $p<0.01$).

The abundances of *Synechococcus*, *Prochlorococcus* and picoeukaryotes varied by two orders of magnitude among sites. *Prochlorococcus* largely dominated picophytoplankton abundance at the oceanic station (87 ± 4 %), and dropped down to 40 and 31 % in Southern and Western shelves to attain minor contributions in the bays (Figure V.4).

Synechococcus represented 12 ± 4 % of picophytoplankton abundance in oceanic waters, and increased in proportion in shelf waters (57-66 %) to reach up to 91% of picophytoplankton cells in the bays. Picoeukaryotic algal cells contributed little to picophytoplankton abundance and increased from 1.2 ± 0.1% in oceanic waters, to 3.9 ± 0.6% in the shelf and 6.5 ± 0.6% in the bays.

Prochlorococcus, Synechococcus biovolumes followed the same pattern than abundances. *Synechococcus* biovolume was around 40 $\mu m^3\ l^{-1}$ in the bays and decreased drastically to 10 $\mu m^3\ l^{-1}$ in oceanic waters. *Prochlorococcus* biovolume ranged from 3 $\mu m^3\ l^{-1}$ in the bays to 23 $\mu m^3\ l^{-1}$ in the oceanic station. Due to their larger size, biovolume contribution of picoeukaryotes was more important but followed the same pattern than abundance. Picoeukaryotes biovolume was around 40 $\mu m^3\ l^{-1}$ in oceanic station and increased slowly with 55-64 $\mu m^3\ l^{-1}$ in the shelf and 103 $\mu m^3\ l^{-1}$ in the bays.

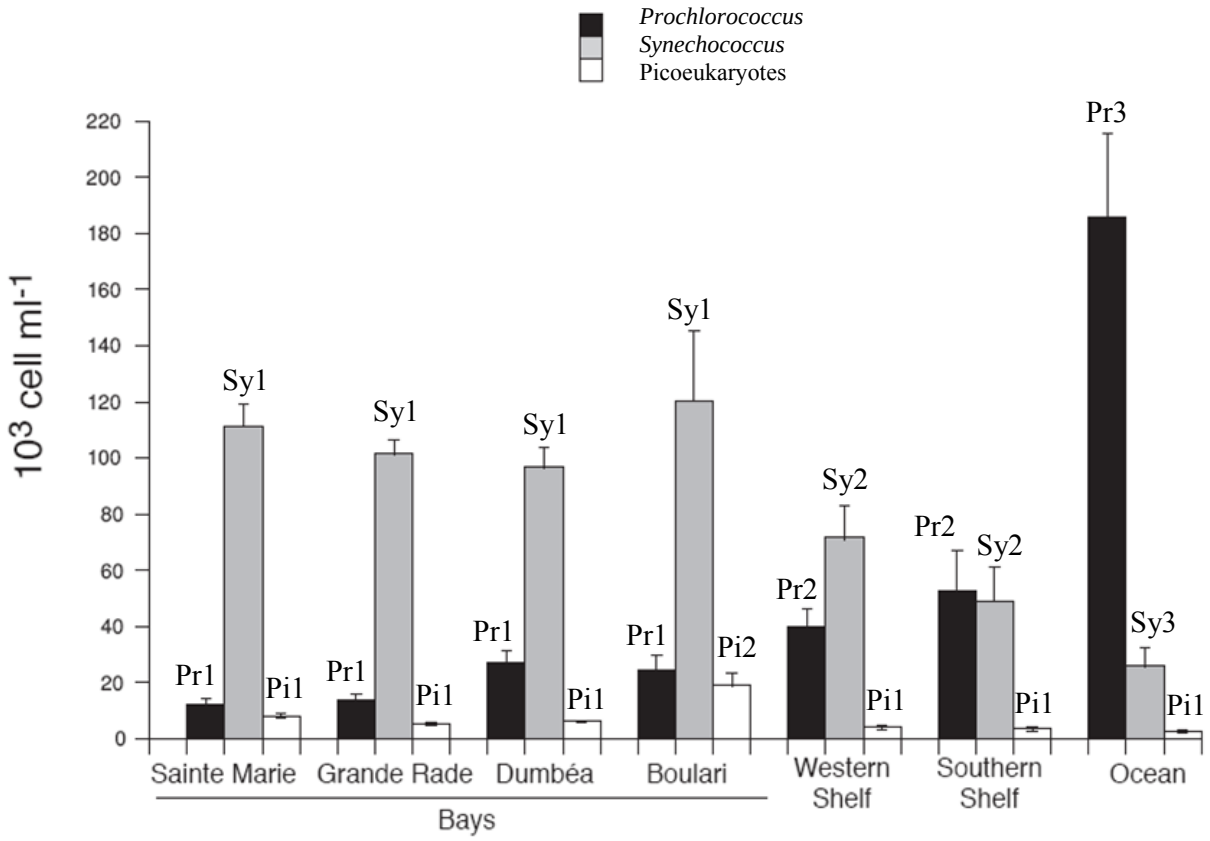


Figure V.4 - Picophytoplankton average abundance in different lagoon areas. Bars represent standard errors. Same letters indicate that averages are significantly equal (ANOVA, p<0.01).

Microalgal abundance varied by 3 orders of magnitude among sites, between 0.2 and 464 x 10^3 cell l^{-1}. The highest phytoplankton abundances and biovolumes were observed in Grande Rade and Sainte-Marie bays, *i.e.* in the most urbanized bays (Figure V.5). Eight phytoplankton classes were identified (see below). However, diatoms, dinoflagellates and coccolithophorids were predominant and contributed all together as 95.5% to total microalgal abundance. The mean (±SE) percentage of undetermined algae was 3.3 ± 0.5 %. Microalgae were significantly more abundant ($p < 0.05$) in the bays than in the lagoon or in the ocean (Figure V.5). However, this higher abundance was mainly caused by an increase in the diatom numbers. This predominance of diatoms was observed in terms of both cell number and biovolume. The mean abundance and biovolume of diatoms were *ca.* 1 x 10^3 to 3 x 10^3 cells l^{-1} and 2.1 to 51.2 mm^3 l^{-1} in the ocean and in the lagoon stations, compared to the bays where the cell number and biovolume always exceeded 20 x 10^3 cells l^{-1} and 311 mm^3 l^{-1}, respectively. In contrast, dinoflagellates and coccolithophorids, although more abundant than diatoms in the ocean and in the lagoon, did not show significant changes in the bays, except for coccolithophorids (Figure V.5).

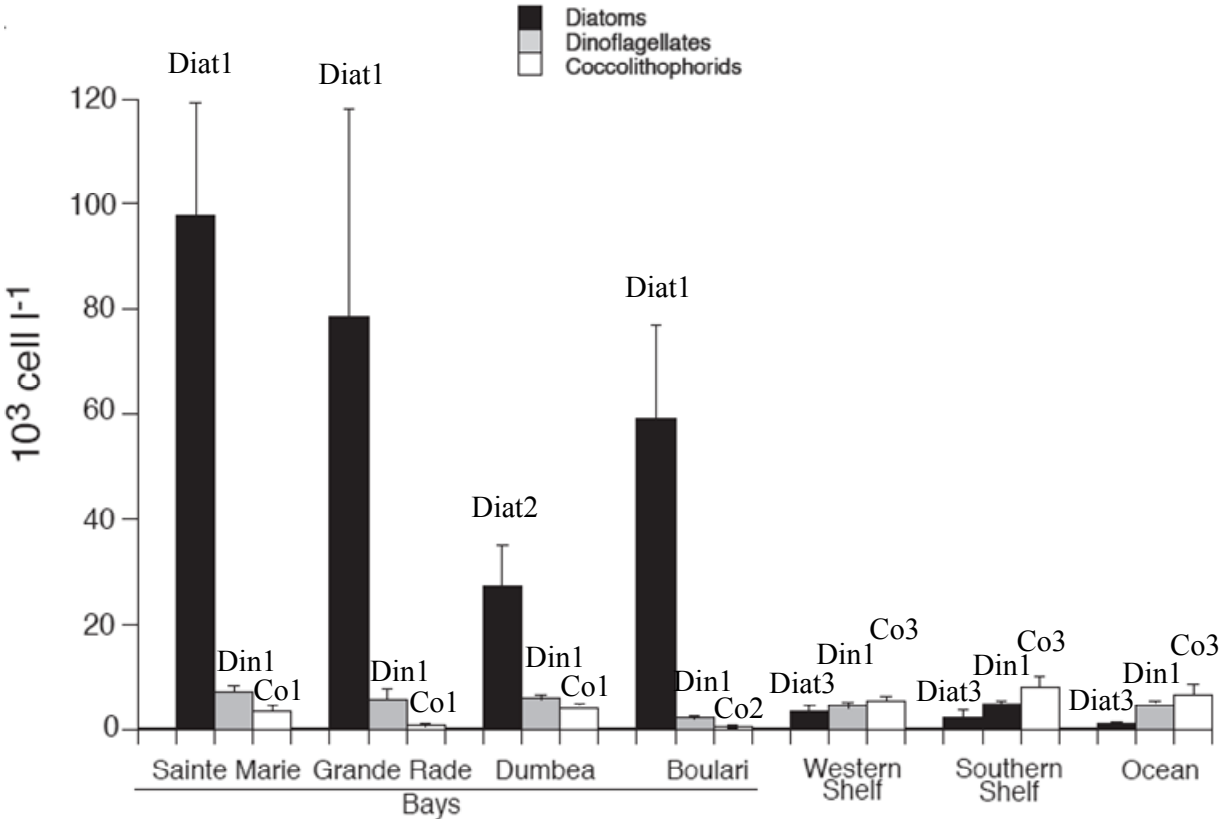


Figure.V.5 - Microalgal average abundance and biovolume in different lagoon areas. Bars represent standard errors. Same letters indicate that averages are significantly equal (ANOVA, $p<0.01$).

A total of 144 microalgal taxa belonging to 8 phytoplankton groups were identified (Table V.3). Diatoms, dinoflagellates and coccolithophorids were the most diversified groups and contributed 50.7 %, 29.2 % and 12.5 % to the total number of taxa respectively. Cyanophytes, prasinophytes, euglenophytes, cryptophytes and dictyochophytes (silicoflagellata) were represented by few species, mainly because the identification of these taxa is difficult with the inverted microscope. Diatoms represented more than half of the identified taxa. They were mainly chain-forming planktonic species. Chaetocerales and Rhizosoleniales were represented by several species. It is interesting that the possibly toxic genus *Pseudonitzschia* was observed in 40 % of the samples with a mean abundance of 11 x 10^3 cells l^{-1} and a maximum of 187 x 10^3 cells l^{-1}. Unfortunately, the identification of *Pseudonitzschia* species was impossible as it required SEM examinations.

Table V.3 - List of the 144 microalgal taxa identified in the 135 samples and the area where they were found in the Southwest lagoon.

	Sainte Marie Bay	Grande Rade Bay	Dumbéa Bay	Boulari Bay	Western Shelf	Southern Shelf	Ocean
DIATOMOPHYTES							
Amphora sp Ehrenberg	■		■				
Asterionellopsis glacialis (Castracane) Round	■	■	■				
Asterionellopsis kariana (Grunow) Round					■		
Asteromphalus heptactis (Brébisson) Ralfs					■		
Bacteriastrum furcatum Shadbolt		■	■		■		
Bacteriastrum hyalinum Lauder	■	■	■		■		
Bacteriastrum spp	■	■	■	■	■	■	■
Cerataulina pelagica (Cleve) Hendey	■	■	■		■		
Chaetoceros anastomosans Grunow in Van Heurck			■				
Chaetoceros atlanticus Cleve		■	■		■		
Chaetoceros coarcatatus Lauder			■	■			
Chaetoceros curvisetus Cleve	■	■	■		■		
Chaetoceros decipiens Cleve	■	■	■		■		
Chaetoceros didymus Ehrenberg		■	■		■	■	■
Chaetoceros laciniosus Schütt	■	■	■		■		
Chaetoceros peruvianus Brightwell	■	■	■		■	■	
Chaetoceros socialis Lauder	■	■	■		■		
Chaetoceros spp	■	■	■	■	■	■	■
Climacodium frauenfeldianum Grunow					■		
Corethron criophilum Castracane			■				
Coscinodiscus sp Ehrenberg emend. Hasle&Sims	■	■	■		■		
Cyclotella sp (Kützing) Brébisson			■				
Dactyliosolen fragilissimus Bergon (Hasle)	■						
Diploneis bombus Ehrenberg		■	■	■	■	■	■
Diploneis sp	■		■			■	■
Entomoneis alata (Ehrenberg) Ehrenberg	■	■	■		■		
Eucampia cornuta (Cleve) Grunow	■					■	
Eucampia zodiacus Ehrenberg			■		■		
Guinardia cylindrus (Cleve) Hasle	■	■	■	■	■		■
Guinardia flaccida (Castracane) Peragallo	■		■		■		
Guinardia striata (Stolterfoth) Hasle	■	■	■	■	■		
Gyrosigma sp Agardh	■				■		
Hemiaulus hauckii Grunow in Van Heurck		■	■		■		■
Hemiaulus sinensis Greville	■	■	■		■		
Lauderia annulata Cleve	■		■	■			
Leptocylindrus danicus Cleve	■		■		■		
Licmophora sp Agardh			■		■		
Lioloma sp Hasle			■	■	■	■	■
Mastoglioa binotata (Grunow) Cleve					■		
Mastoglioa fimbriata (Brightwell) Cleve			■				
Mastoglioa sp Thwaites			■		■		
Melosira granulata (Ehrenberg) Ralfs					■		
Melosira sp Agardh		■	■				
Navicula sp Bory de St. Vincent	■	■	■	■		■	■
Nitzschia bicapitata Cleve	■		■		■	■	■
Nitzschia closterium (Ehrenberg) Wm. Smith	■	■	■	■	■	■	■
Nitzschia distans Gregory			■				
Nitzschia longissima (Brébisson) Ralfs	■	■			■		
Nitzschia maxima Grunow	■				■		
Nitzschia punctata var coarctata (Grunow) Diaz-Ramos	■						
Nitzschia sp	■	■	■		■		
Odontella sinensis (Greville) Grunow		■					
Pleurosigma angulatum (Quekett) Wm. Smith			■	■	■		

Table V.3 - continued

	Sainte Marie Bay	Grande Rade Bay	Dumbéa Bay	Boulari Bay	Western Shelf	Southern Shelf	Ocean
Pleurosigma fasciola Wm. Smith	■		■		■		
Pleurosigma sp Wm. Smith	■	■	■	■	■	■	
Proboscia alata (Brightwell) Sundström		■	■		■		
Pseudonitzschia sp H. Peragallo	■	■	■	■	■	■	■
Pseudosolenia calcar-avis (Schultze) Sundström	■	■	■	■	■	■	
Rhabdonema adriaticum Kützing					■		
Rhaphoneis sp Ehrenberg	■						
Rhizosolenia imbricata Brightwell	■	■	■	■	■	■	
Rhizosolenia robusta Norman in Pritchard			■				
Rhizosolenia setigera Brightwell	■	■	■	■	■		
Rhizosolenia sp Brightwell	■	■	■				
Rhopalodia gibba (Ehrenberg) O. F. Müller			■				
Skeletonema costatum (Greville) Cleve	■		■				
Surirella sp Turpin			■				
Synedra sp Ehrenberg		■			■		
Thalassionema frauenfeldii (Grunow) Hallegraeff	■	■	■	■	■	■	■
Thalassionema nitzschoides (Grunow) Mereschkowsky	■	■	■	■	■	■	■
Thalassiosira sp Cleve	■	■	■		■	■	
Trachyneis aspera (Ehrenberg) Ehrenberg		■	■				
DINOPHYTES							
Amphidinium sp Clarapède &Lachmann			■		■		
Ceratium breve (Ostenfeld & Schmidt) Schröder					■		
Ceratium candelabrum (Ehrenberg) Stein						■	
Ceratium furca (Ehrenberg) Clarapède &Lachmann	■	■	■	■	■	■	
Ceratium fusus (Ehrenberg) Dujardin		■	■		■		
Ceratium pentagonum Gourret	■		■		■		
Ceratium tripos (O.F. Müller) Nitzsch			■	■			■
Ceratium sp Schrank		■					
Cochlodinium sp Schütt		■	■	■	■	■	
Corythodinium tesselatum (Stein) Loeblich Jr. & Loeblich III	■	■	■		■	■	
Dinophysis caudata Saville-Kent		■	■				
Dinophysis sp		■	■		■	■	■
Gonyaulax kofoïdii Pavillard		■					
Gonyaulax sp Diesing	■	■	■	■	■	■	■
Gymnodinium sp Stein	■	■	■		■		
Gyrodinium sp1	■	■	■	■	■	■	■
Gyrodinium sp2			■		■	■	■
Heterocapsa sp Stein	■	■	■	■	■		■
Histioneis sp Stein					■		
Lingulodinium polyedrum (Stein) Dodge		■	■				
Micracanthodinium sp Deflandre					■		■
Ornithocercus magnificus Stein		■	■		■		
Oxytoxum scolopax Stein					■		■
Oxytoxum subulatum Kofoid			■		■	■	
Oxytoxum sp1	■	■	■	■	■	■	■
Oxytoxum sp2		■	■		■	■	■
Oxytoxum spp				■	■	■	■
Podolampas bipes Stein		■			■	■	
Podolampas spinifera Okamura			■		■	■	
Polykrikos kofoidii Chatton						■	
Pronoctiluca acuta (Lohmann) Schiller			■	■	■	■	■
Prorocentrum aff.mexicanum Tafall	■	■	■	■	■	■	■
Prorocentrum gracile Schütt	■	■	■	■	■	■	■
Prorocentrum micans Ehrenberg	■	■	■	■	■	■	
Prorocentrum scalpellum	■		■		■	■	

Table V.3 - continued

	Sainte Marie Bay	Grande Rade Bay	Dumbéa Bay	Boulari Bay	Western Shelf	Southern Shelf	Ocean
Prorocentrum spp	■	■	■	■	■	■	■
Protoperidinium bispinum					■		
Protoperidinium depressum (Bailey) Balech							
Protoperidinium elegans (Cleve) Balech		■	■				
Protoperidinium globosum			■	■			
Protoperidinium oceanicum (VanHöffen) Balech		■					
Protoperidinium sp Berg	■	■	■	■	■	■	■
COCCOLITHOPHORIDS							
Acanthoica quattrospina Lohmann	■		■		■	■	■
Algirosphaera sp Schlauder					■	■	
Anoplosolenia brasiliensis (Lohmann) Deflandre	■	■	■	■	■	■	■
Calciosolenia murrayi Gran	■		■		■	■	
Discosphaera tubifer (Murray & Blackman) Ostenfeld			■		■	■	■
Emiliania huxleyi (Lohmann) Hay & Mohler	■	■	■	■	■	■	■
Gephyrocapsa oceanica Kamptner	■	■	■	■	■	■	■
Halopappus adriaticus Schiller, emend. Manton, Bremer			■		■	■	
Helicosphaera carteri (Wallich) Kamptner			■		■		
Helladosphaera sp Kamptner			■	■	■	■	■
Michaelsarsia elegans Gran, emend. Manton, Bremer & Oates	■		■		■	■	■
Ophiaster hydroideus (Lohmann) Lohmann, emend Manton & Oates	■	■	■		■	■	■
Pontosphaera sp Lohmann					■		
Rhabdosphaera sp Haeckel			■		■	■	■
Syracosphaera sp Lohmann	■		■		■	■	■
Umbellosphaera irregularis Paasche	■		■		■	■	■
Umbellospahera tenuis (Kamptner) Paasche			■		■	■	■
Umbilicosphaera sibogae (Weber-van-Bosse) Gaarder	■		■		■	■	■
CYANOPHYTES							
Anabaena sp St. Vincent, Ex Bornet and Flah					■		
Lyngbya sp Agardh Ex Gomont					■		
Oscillatoria sp Vaucher Ex Gomont			■	■	■	■	■
Pseudanabaena sp Lauterborn						■	
Richelia intracellularis J. Schmidt in Ostenfledt & Schmidt	■	■	■	■			
PRASINOPHYTES							
Pachysphaera sp Ostenfeld			■		■	■	■
Pyramimonas sp1 Schmarda	■		■		■		■
Pyramimonas sp2 Schmarda	■	■	■		■	■	■
EUGLENOPHYTES							
Euglena sp Ehrenberg	■	■	■		■	■	
CRYPTOPHYTES							
Undetermined	■	■	■	■	■	■	■
DICTYOCHOPHYTES							
Dictyocha fibula Ehrenberg		■	■		■	■	■
DIATOMOPHYTES	42	38	57	18	49	18	14
DINOPHYTES	14	24	29	15	31	22	16
COCCOLITHOPHORIDS	10	4	16	4	18	16	13
OTHERS	5	5	8	3	9	7	6
Total	71	71	110	40	107	63	49

V.5. DISCUSSION

Few studies have investigated the relationships between the nutrient concentrations and phytoplankton in coral reef waters. Most of them focused on the global estimates of phytoplankton abundances, *i.e.* total or size fractionated Chl.*a* (*e.g.* Delesalle & Sournia 1992, Charpy & Blanchot 1999) while the effects of nutrients on the structure of the phytoplankton communities were seldom considered (Sakka et al. 1999, Van Duyl et al. 2002). Considering the phytoplankton as a single ecological and physiological unit does not allow the study of the varying impacts of different phytoplankters on matter and energy cycles in the ocean. Although size fractionation captures some of the functional differences between groups of phytoplankters (Agawin et al. 2000), it is useless as a tool to discriminate between groups of similar size. Indeed, diatoms and dinoflagellates which are the major groups of large phytoplankters exhibit important physiological and ecological differences (Goericke 2002) and within picophytoplankton cells, *Prochlorococcus* and *Synechococcus* may utilize different N sources (Moore et al. 2002) and are consumed by flagellates at different rates (Christaki et al. 1999, 2002). Thus, the effects of nutrients on the phytoplankton in the south-western lagoon of New Caledonia were considered not only on total Chl.*a*, but also on various variables describing the phytoplankton community structure, *i.e.* size-fractionated Chl.*a*, picophytoplankton abundance and composition, and abundance, composition and biovolumes of nano- and microphytoplankton.

V.5.1. LIMITING NUTRIENT

The median value of the DIN:DIP ratio (4.5:1) was considerably lower than the classical (16:1) Redfield ratio whereas, in contrast, the Si:DIN ratio (23.3) was far exceeding the Redfield ratio (1:1). However, N:P ratio alone cannot assess the nutrient status of phytoplankton but requires comparison of nutrient concentrations with threshold literature values (Dortch & Whitledge 1992). Using literature threshold values (DIN $\leq$ 1 µM, DIP $\leq$ 0.1 µM and $SiO_2 \leq 2$ µM, Justic et al 1995) and according Justic et al. 1995's criteria, P is limiting if Si:DIP > 22 & DIN:DIP> 22, N is limiting if DIN:DIP<10 & Si:DIN > 1, and Si is limiting if Si:DIP<10 & Si:DIN<1.

Therefore, nutrient values strongly suggest that N was the limiting nutrient in the large majority of the samples in New Caledonia SW lagoon (Table V.4). This N limitation is in agreement with the much shorter turnover time (concentration:uptake rate) for ammonium than

for DIP in the same area (Torréton et al. in prep.). This limitation by nitrogen is not surprising since coral reef waters were often considered N-limited. Indeed, N-limitation was reported in the tropical pacific waters off the Tuamotu archipelago (Dufour et al. 1999), in most of the 12 Tuamotu atoll lagoons studied (Dufour & Berland 1999, Torréton et al. 2000), and in the Caribbean (Van Duyl et al. 2002). In the SW lagoon of New Caledonia, the distribution of phytoplankton variables can thus be examined *vs.* DIN concentrations, without taking into account the other macronutrients. It can be argued that Fe concentrations may limit the phytoplankton development, as observed in HNLC (high nutrient low chlorophyll) areas. However, Fe limitation is very unlikely in New Caledonia lagoon where the soils are known for their richness in several metals including Fe (Latham 1981). Indeed, Fe concentrations are 0.6 - 2 nM in the Loyalty Channel on the east coast of New Caledonia (M. Rodier, *pers. com.*), far exceeding the limiting Fe concentrations of 0.13 nM in the Equatorial Pacific (Coale et al. 1996). The SW lagoon of New Caledonia receives considerably higher terrigeneous inputs than the Loyalty Channel (Ambatsian et al. 1997) and, therefore, Fe-limitation is vey unlikely to occur.

Table V.4 - Percentage of samples in which nutrient ratios and concentrations suggest nutrient limitation. Number of samples in brackets.

	Ocean (10)	Southern Shelf (15)	Western Shelf (50)	Boulari Bay (35)	Dumbea Bay (59)	Grande Rade (49)	Sainte-Marie Bay (47)
P limiting	0	20	2	6	10	4	9
N limiting	86	80	88	77	75	69	64
Si limiting	0	0	0	0	0	0	0
None of the 3	14	0	10	17	15	27	27

Table V.5 - Model II log-log regressions of Chl.*a* in size-classes and phytoplankton groups vs. DIN, NH_4 and (NO_3+NO_2).
a = log-log slope (95% CL), b = intercept, r = determination coefficient, *** : P < 0.001, ** : P < 0.01, * : P < 0.05, NS : Not Significant.
Units are µg l^{-1}, 10^3 cells l^{-1}, cells l^{-1} and µM for Chl.*a*, picoplankton, microalgae and nutrients, respectively.

	vs. DIN				*vs.* NH_4				*vs.* NO_3+NO_2			
	a	b	r	p	a	b	r	p	a	b	r	p
Total chlorophyll *a* (GF/F)	0.38 (0.27 - 0.49)	-0.15	0.95	***	0.34 (0.18 - 0.52)	-0.12	0.87	**	0.25 (0.18 - 0.32)	-0.00	0.92	***
Chlorophyll *a* < 2 µm	0.14 (0.04 - 0.24)	-0.65	0.77	*	0.11 (0.01 - 0.21)	-0.64	0.69	*	0.18 (0.12 - 0.24)	-0.52	0.92	***
Chlorophyll *a* 2-10 µm	0.81 (0.58 - 1.10)	-0.33	0.96	***	0.77 (0.45 - 1.22)	-0.20	0.93	**	0.44 (0.17 - 0.76)	-0.41	0.81	**
Chlorophyll *a* > 10 µm	0.87 (0.50 - 1.43)	-0.24	0.94	**	0.51 (0.14 - 1.04)	-0.32	0.86	*	0.35 (0.26 - 0.46)	-0.58	0.95	***
	-				-				-			
Prochlorococcus	-0.63 (-0.82 - -0.46)	0.91	0.96	***	-0.78 (-1.10 - -0.54)	0.79	0.97	***	-0.42 (-0.61 - -0.25)	0.62	0.89	***
Synechococcus	0.16 (0.05 - 0.27)	2.02	0.81	**	0.17 (0.06 - 0.30)	2.06	0.86	**	0.06 (0.05 - 0.08)	2.09	0.96	***
Picoeukaryotes	0.26 (0.20 - 0.33)	0.79	0.97	***	0.24 (0.16 - 0.32)	0.82	0.96	**	0.16 (0.11 - 0.21)	0.89	0.90	***
	-				-				-			
Diatoms	1.32 (0.73 - 2.74)	4.58	0.82	**	1.13 (0.61 - 2.18)	4.57	0.84	**	0.69 (0.23 - 1.50)	4.95	0.69	*
Dinoflagellates	0.41 (0.21 - 0.64)	3.91	0.87	**	0.34 (0.16 - 0.54)	3.90	0.85	**			0.26	NS
Coccolithophorids	0.82 (0.48 - 1.33)	4.02	0.92	**	0.42 (0.19 - 0.70)	3.78	0.86	**			0.24	NS

V.5.2. RELATIONSHIPS BETWEEN NUTRIENTS AND PHYTOPLANKTON VARIABLES

Nitrogen being the main limiting factor, we therefore examined the relationships between phytoplankton variables and DIN concentrations. The model II regressions (Table V.5) showed that all phytoplankton variables displayed significant relationships with all forms of dissolved inorganic nitrogen. The only exception was dinoflagellates and coccolithophorids abundances *vs.* (NO_3+NO_2). All relationships were positive, except for *Prochlorococcus*, for which abundance decreased with increasing nitrogen concentrations.

V.5.2.1. Size classes

The slope was significantly lower for the <2 µm fraction than for the two other size fractions (Table V.5). The relative contribution of <2 µm phytoplankton to total biomass (in terms of Chl.*a*) therefore decreases with increasing trophic status (Figure V.3). This in agreement with meta-analyses of data from various marine (*e.g.* Chisholm 1992, Agawin et al. 2000), and freshwater environments (Bell & Kalff 2001), although some of these trends may be corrupted by spurious correlations when chlorophyll is used to define the trophic status (Berges 1997). Several hypotheses were formulated to explain the shift from smaller to larger cells with increasing trophic conditions. Firstly, it could be linked to a higher NH_4:DIN ratio in oligotrophic systems (Chisholm 1992, Rodriguez et al. 2001) and to a better affinity of picophytoplankton for NH_4 than for nitrate (Wheeler & Kirchman 1986, Laws et al. 2000). This preference is however not observed by Sherr et al. (1982) and Furnas (1983), and is not supported by our results. In the SW lagoon of New Caledonia, the NH_4:DIN ratio is rather high (0.69 on average) but does not vary significantly according to the distance from the coast (Table V.2). In addition, no significant relationship can be outlined between the relative contribution of picoplankton to total phytoplankton and the NH_4:DIN ratio (data not shown). Secondly, the shift to larger cells with increasing DIN concentrations can be explained by the larger surface to volume ratio of the smaller cells, leading to a more efficient uptake nutrients in oligotrophic waters (Legendre & Rassoulzadegan 1995) together with a better molecular diffusion (Chisholm 1992). Alternatively, the intrinsic capacity of larger cells to multiply faster than smaller cells when they are not limited by nutrient diffusion has been demonstrated (Agawin et al. 2000, Fernández et al. 2003). Finally, a lower predation on larger cells can be hypothesised as phytoplankton develops faster in enriched conditions than mesozooplankton (Samuelsson et al. 2002).

V.5.2.2. Picophytoplankton groups

On the whole lagoon, except in Sainte-Marie bay, the <2 µm fraction predominated and was mainly constituted of *Synechococcus*. This pattern in phytoplankton size fraction has often been observed in oligotrophic coral reef waters (*e.g.* Charpy & Blanchot 1999, Sakka et al. 1999, Van Duyl et al. 2002, Tada et al. 2003). The three components of the picoplankton compartment, *i.e. Prochlorococcus*, *Synechococcus* and picoeukaryotes, behaved differently according to the DIN concentrations (Figure V.6). As shown by the regressions of the Table V.5, a significant shift from a *Prochlorococcus* to a *Synechococcus* dominance was observed with increasing DIN concentrations (0.03 to 3.24 µM). The *Prochlorococcus* dominance at the most oligotrophic stations agrees with similar observations in the tropical Pacific Ocean (Blanchot & Rodier 1996) and in tropical Atlantic Ocean (Partensky et al. 1996). Similarly, a higher abundance of *Synechococcus* in relatively enriched waters was reported by Campbell et al. (1994) in the Pacific area and by Partensky et al. (1999) in the Atlantic Ocean. The slightly decreasing ratio between cyanobacteria and picoeukaryotes with increasing DIN concentrations (Figure V.6) can be related to both the greater size of picoeukaryotes modifying nutrient uptake abilities and/or grazing efficiencies, and photosynthetic content modifying adaptation to ambient light for picoeukaryotes (Partensky et al. 1999).

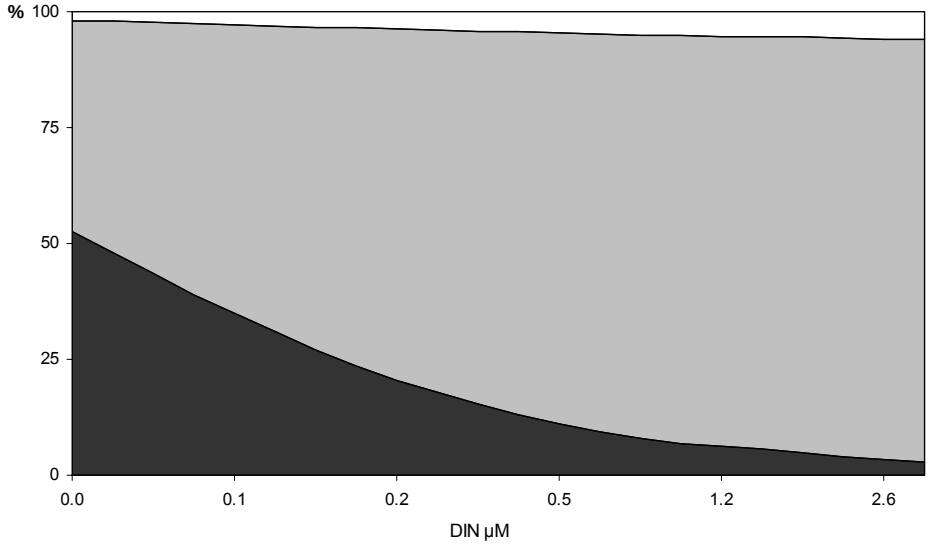


Figure V.6 - Percent contributions of *Prochlorococcus* (black), *Synechococcus* (grey) and picoeukaryotes (white) to total picophytoplankton abundance versus DIN concentrations. Values computed from Table V.5 relationships.

V.5.2.3. Microphytoplankton groups

The community composition of nano- and microalgae also displayed drastic changes with varying DIN concentrations (Figure V.7). Regression fits show that cells >10 µm are responsible for a large part of the increase of phytoplankton biomass at higher DIN concentrations, and, that this increase was due to diatoms. Indeed, the slopes were significantly higher for diatoms than for dinoflagellates and coccolithophorids (Table V.5), and dinoflagellates and coccolithophorids were replaced by diatoms when DIN concentrations increased from 0.03 to 2.65 µM. In addition, diatoms were the only microalgal group showing a positive correlation with nitrates (Table V.5). This trend is in agreement with results of taxon-specific nitrogen uptake rates determined in the Baltic Sea (Berg et al. 2003). Similarly, during a temporal survey in the bay of Ouinné (East Coast of New Caledonia), Tenório et al. (in revision) also found important variations of phytoplankton community structure related to terrigeneous nutrient inputs. Dry seasons, corresponding to to low freshwater inputs and low nutrient concentrations, were characterized by populations dominated by picophytoplankton and microcyanobacteria, whereas, eukaryotic populations dominated during wet seasons.

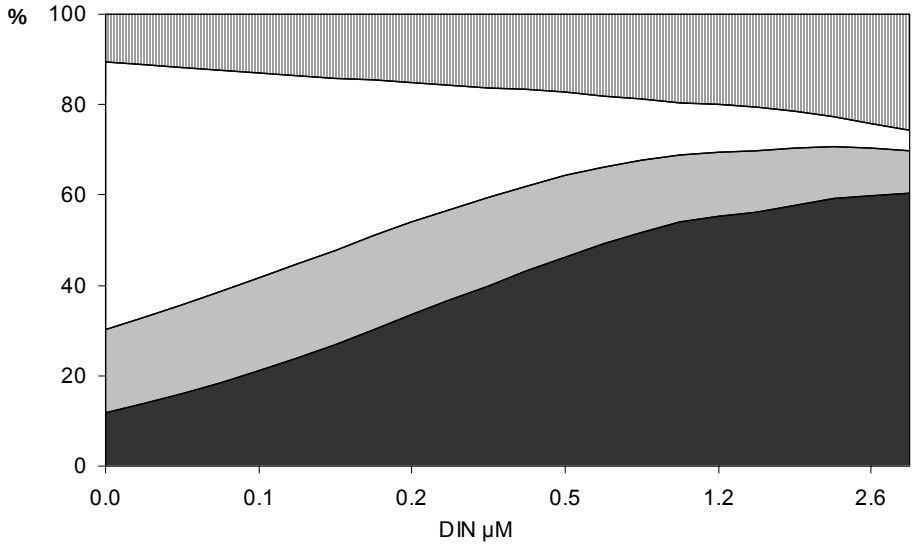


Figure V.7 - Percent contributions of diatoms (black), coccolithophorids (grey), dinoflagellates (white) and others (stripped) to total microphytoplankton abundance as a function of DIN concentration. Values computed from Table V.5 relationships.

The silicate concentrations are critical for diatom growth (Egge & Aksnes 1992) and a silicate deficiency can lead to dinoflagellate blooms if DIN is available (Officer & Ryther 1980). During enrichment experiments, Egge and Aksnes (1992) determined a threshold of 2 µM Si beyond which diatoms become dominant. In the present study, 63 % of the silicate concentrations exceeded this threshold. These concentrations above threshold were essentially

encountered in the bays. Therefore, the predominance of diatoms in the bays in response to higher DIN concentrations was likely favoured by correspondingly higher Si concentrations. Similar observations are reported in other coral reef environments by Revelante et al. (1982), Furnas & Mitchell (1986) and Van Duyl et al. (2002) and in other environments (*e.g.* temperate coastal seas, Philippart et al. 2000). Short term nutrient enrichments, either natural, following a cyclone (Delesalle et al. 1993) or experimental (Sakka et al. 1999, Estrada et al. 2003) also resulted in a predominance of diatoms in atoll environments. Therefore, as Chisholm (1992) already stated in temperate waters, diatoms play the primary role in increasing the phytoplankton biomass in these tropical environments.

The four bays considered in the sampling design were subjected to various human impacts, receiving either urban wastes (Sainte-Marie Bay), urban and industrial wastes (Grande Rade Bay), or agricultural wastes (Boulari and Dumbéa bays). Indeed, Sainte-Marie Bay, and to a lesser extent Grande Rade Bay, displayed significantly higher DIN, total chlorophyll *a* concentrations, and microphytoplankton and diatoms abundances than in the other bays whereas the picoplankton composition did not significantly differ. Finally, the agricultural inputs in Dumbéa and Boulari bays resulted in significant but often moderate phytoplankton development compared to the western shelf.

V.5.2.4. Comparison with previous studies

The mean Chl.*a* concentration (0.45 ± 0.02 µg l^{-1}) determined in this study is similar to values obtained in various other coral reef lagoons in the world, either in the Great Barrier Reef (Furnas et al. 1990), in French Polynesia (Charpy & Blanchot 1999, Dufour & Berland 1999, Sakka et al. 1999, Delesalle et al. 2001), in Fiji Islands (Charpy & Blanchot 1999), in Curaçao Island (Van Duyl et al. 2002) or in Okinawa Island, Japan (Tada et al. 2003).

The chlorophyll concentrations observed in this study can be compared to the results obtained by Rougerie (1985) from the same area in order to evaluate the temporal evolution of the phytoplankton biomass over 25 years. The average chlorophyll concentrations computed by Rougerie (1985) from *ca.* 20,000 samples collected between 1976 and 1979 in the whole south-western lagoon are also very similar to ours (0.57±0.18 *vs.* 0.47±0.02 µg Chl.*a* l^{-1}). He observed a decrease of Chl.*a* concentrations with the distance from the coast, similar to our results, and reports average Chl.*a* values in the bays near Nouméa similar to ours (0.72 *vs.* 0.60-0.82 µg Chl.*a* l^{-1} in our study). The DIN concentrations also show similar concentrations (0.87 *vs.* 0. 94 µM) in the bays near Nouméa. Since Rougerie (1985)'s study, the population of Nouméa City

increased by *ca*. 75% and the sewage treatment is still insufficient. At first glance, increased urbanisation does not seem to result in both higher phytoplankton biomass and higher nutrient concentrations in the coastal part of the lagoon. This apparent stability is in agreement with a biogeochemical box model simulation of nutrient inputs (Bujan et al. 2000) and can be explained by a limited residence time of waters in the bays which can lead to export of the newly produced phytoplankton from the bays to the western shelf or the nearby ocean. Alternatively, the low phytoplankton biomass could also be explained by consumption in the bays by an increasing biomass of filter-feeding benthic organisms. It should be noted, however, that the maximum concentration of both nitrogen and Chl.*a* differ significantly between the seventies and our study. Rougerie (1985) reported a maximum Chl.*a* value of 1.01 µg l^{-1} whereas we measured more than twice this value (2.4 µg l^{-1}).

In summary, the 7 areas studied in the SW lagoon of New Caledonia are characterized by distinct macronutrient concentrations, with the bays in the urbanized area showing the largest departure from average lagoon conditions. Nitrogen is probably the macronutrient that drives phytoplankton community composition. We have shown that the elevated nitrogen concentrations in the bays resulted in increased phytoplankton biomass, together with significant shifts in the phytoplankton community structure. These changes are not only restricted to changes in phytoplankton size. Regarding picoplankton, the *Prochlorococcus* dominated consortia in the surrounding oceanic and southern lagoon shelf waters are replaced by *Synechococcus* dominated populations in the bays combined with an increasing proportion of picoeukaryotic phytoplankton. Regarding microphytoplankton, nutrient enrichments in the bays favour large diatoms and the possibly toxic diatom, *Pseudonitzschia* was often observed in the samples. Similarly, *Trichodesmium* blooms are frequently observed in Sainte-Marie Bay. Even if, on the whole, the mean phytoplankton biomass did not change significantly in 25 years, the appearance of blooms may reveal disequilibrium in the structure of the planktonic food web. A wider consideration of the planktonic food web, similar to the one successfully used in French Polynesia in order to evaluate the possibly noxious impacts of the pearl oyster aquaculture (Niquil et al. 2001) has to be considered in order to evaluate the human impacts on the whole planktonic community.

Acknowledgements: This work was supported by the Institut Français de Recherche pour le Développement (IRD), grants from the Programme National Environnement Côtier (PNEC) and a grant from the Ministère de l'Outre-Mer. We express our gratitude to J. Bargibant, S. Tereua and A. Lapetite and the crew of the IRD RV 'Alis' for their efficient help during sample collection and to E. Rochelle-Newall for linguistic corrections. This manuscript benefited from comments of 3 anonymous reviewers.

CHAPITRE VI

Evolution spatiale et temporelle de la structure des communautés bactériennes

CHAPITRE VI. EVOLUTION SPATIALE ET TEMPORELLE DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

Spatial and temporal variations of bacterioplankton community structure in the Southwestern Lagoon of New Caledonia[10]

Séverine JACQUET, Robert DURAN, Jean-Pascal TORRETON, Marc TROUSSELLIER

VI.1. RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

De nombreuses études se sont intéressées aux variations spatiales et temporelles de la structure de ces communautés en milieu aquatique. Toutefois, les variations spatiales sont le plus souvent étudiées le long de gradients trophiques associés à des changements des conditions physiques comme la salinité. De manière comparable, les variations temporelles observées en milieu tempéré s'accompagnent également de variations importantes des conditions physiques comme la température sans commune mesure avec celles reportées en milieu tropical.

La structure des communautés bactériennes n'a jamais fait l'objet d'étude dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie et très peu de travaux ont été effectuées sur ce thème en milieu corallien. Nous nous sommes intéressés ici à leur évolution spatiale le long de gradients trophiques et temporelle au cours d'un suivi annuel. Les communautés bactériennes attachées aux particules (>1,2 µm) et libres (<1,2 µm et >0,2 µm) dans la colonne d'eau sont décrites à partir de l'étude du polymorphisme des fragments terminaux de restriction des gènes codant pour l'ARNr 16S. Les analyses montrent que ces deux communautés ont peu de génotypes en commun et doivent donc être considérées séparément.

Le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie, comprenant la ville de Nouméa, est soumis à des apports terrigènes et anthropiques qui entraînent des gradients trophiques décroissant des côtes vers le large. L'influence de ces gradients sur la structure des communautés bactériennes a été étudiée le long de radiales côte-large présentant une large gamme de conditions trophiques révélées par la décroissance de la production bactérienne et de la chlorophylle *a*. La composition des communautés bactériennes montre de faibles, mais significatives, variations le long de la

[10] Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication prochainement soumise à Microbial Ecology

plupart des radiales côte-large dans les baies autour de la ville de Nouméa pour des conditions physiques (température, salinité) ne variant pratiquement pas. Toutefois, en moyenne 50 % de la population persiste dans les différents environnements trophiques, et ce faible contraste entre les communautés ne permet pas de mettre en évidence une influence nette des facteurs environnementaux.

Le suivi pendant une année d'une station représentative des conditions lagonaires, montre une remarquable stabilité de la structure des communautés bactériennes libres. Au contraire, l'indice de similarité entre échantillonnages successifs des populations attachées aux particules indique d'importantes variations temporelles à court terme, qui pourraient être dues à la fois à la dynamique particulaire, très dépendante du vent variant à court terme, aux relations allélopathiques entre bactéries attachées et aux successions écologiques sur les particules nouvellement formées ou attachées. Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre la structure des communautés et les paramètres environnementaux.

VI.2. INTRODUCTION

The number of studies on bacterioplankton has increased since Pomeroy (1974) showed their importance as consumers of organic matter and since Azam et al. (1983) demonstrated that the "microbial loop" is an integral part of the pelagic food webs. Most of these studies considered the bacterial compartment as a black box and measured only the flows entering and exiting the box and so failed to take into account the heterogeneity of the compartment, especially the taxonomical composition and its potential consequences on bacterioplankton mediated processes.

The number of studies on bacterial diversity in marine habitats has increased with the introduction in 1990's of molecular techniques. These techniques, principally centered on the analysis of SSU rRNA gene sequences, allowed a better bacterial phylogenetic description (Giovannoni & Rappé 2000) in areas as diverse as hydrothermal vent systems (Moyer et al. 1995), the oligotrophic Sargasso Sea (Giovannoni et al. 1990, Field et al. 1997), surface waters of North Pacific and central Atlantic Oceans gyres (DeLong et al. 1993), and North Eastern Pacific continental shelf waters (Rappé et al. 2000). In parallel to the phylogenetic description, studies on spatial (horizontal, vertical) and temporal distribution of specific bacterioplankton communities became more numerous, especially in contrasted (estuarine, upwelling) systems. Nevertheless, a clear understanding of factors governing variability in bacterioplankton community composition is still lacking.

Different factors may have an influence on bacterioplankton community structure. Abiotic factors such as extreme temperature (e.g. hot springs, Ferris et al. 1997, Shiah & Ducklow 1994), salinity (Murray et al. 1996, Crump et al. 1999, Bouvier & Del Giorgio 2002), organic carbon bioavailability (high and low molecular-weight DOC, Weinbauer & Höfle 1998), inorganic nutrients (Zweifel et al. 1993). Biotic factors such as predation by protists (Suzuki 1999, Simek et al 2001), or viruses (Riemann & Middelboe 2002, Schwalbach et al. 2004) may also play a role in determining bacterial community structure.

Coastal eutrophication is a widespread phenomenon. It is essentially due to the mobilization of N and P by human activities which has led to an acceleration of the fluxes of these elements to coastal waters (Nixon 1995). The studies on the effects of nutrient enrichment on the bacterial communities are scarce (Pinhassi et al. 2003) and studies which tackle the effect of nutrient availability on bacterial diversity are often realized in mesocosms (Eilers et al. 2000, Fisher et al. 2000, Fuchs et al. 2000, Covert & Moran 2001, Schäfer et al. 2001). However, extrapolation to *in situ* processes is risky since confinement itself may alter community composition (Ferguson et al. 1984, Schäfer et al. 2001, Massana et al. 2001). A few studies have dealt with bacterial communities modifications along coast – open sea gradients (Acinas et al. 1997, Schauer et al. 2000, Riemann & Middelboe 2002), and most take place within estuarine environments where trophic and physical gradients are usually sharper (Bidle & Fletcher 1995, Troussellier et al. 2002, Stepanauskas et al. 2003, Hewson & Fuhrman 2004).

Coral reef lagoons, like many coastal waters, are increasingly subjected to elevated nutrient loadings originating from human activities which results in the eutrophication of the environment (Zann 1994, Lapointe et al 2004, Loya et al. in press,). The southwest lagoon of New Caledonia is oligotrophic to mesotrophic (Jacquet et al. *in revision*) and weak but significant eutrophication gradients, due to the presence of the city of Nouméa which discharges industrial and waste waters with minimal or no treatment, can be observed. A previous study showed that phytoplankton communities change drastically as a function of nutrient concentrations within a limited range of eutrophication in this environment (0.2 to 2 µg Chl.*a* l^{-1}, Jacquet et al. *in revision*). Therefore, the first objective of this study was to determine if bacterioplankton community structure also changed in relation to trophic conditions.

Bacteria may be functionally separated into free-living and those attached to particles. Differences between these fractions have been well documented in terms of abundance, metabolic activity or diversity (DeLong et al. 1993 and references therein).

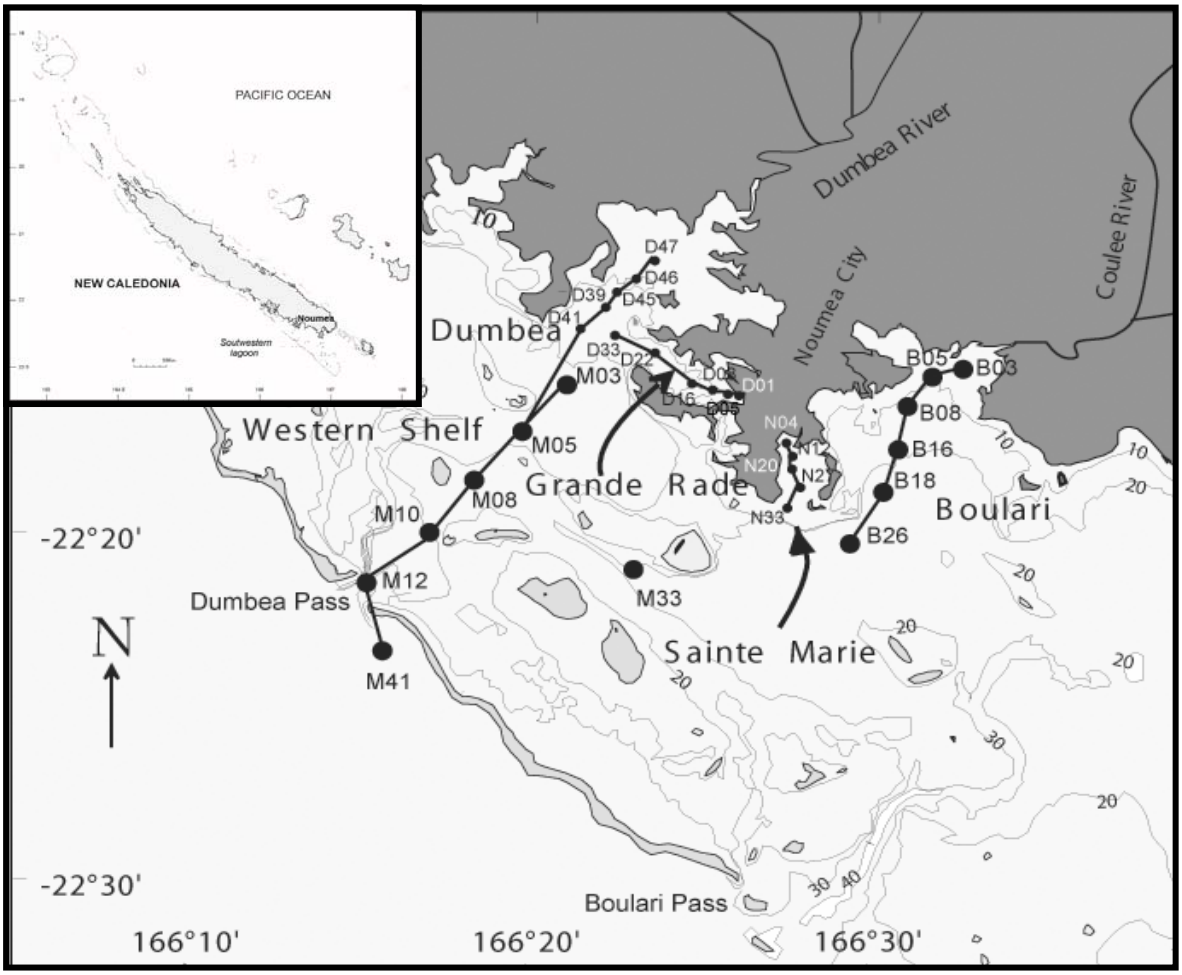


Figure VI.1 - Location of sampling stations. Five transects were sampled in January 2003 for spatial analysis of bacterial community structure, Grande Rade and Sainte Marie are the most anthropized areas. Boulari and Dumbéa are mostly under terrigeneous influence. The Western Shelf is the most oligotrophic transect. Station M33 was sampled weekly or bimonthly during one year.

Particle-attached bacteria contribute to a highly variable percentage of total abundance and biomass across systems, dependent upon the amount and degradability of particulate material. The community structure of particle-attached bacteria appears to be generally different than that of free-living bacteria (DeLong et al. 1993, Bidle & Fletcher 1995, Acinas et al. 1997, Rath et al. 1998, Acinas et al. 1999, Crump et al. 1999, Fandino et al. 2001) with few exceptions (Hollibaugh et al. 2000). In view of these possible differences, as a second objective, we investigated the bacterial community composition of these two fractions. Finally, we tried to establish whether bacterioplankton assemblages present temporal variations in their community composition over an annual cycle.

The study presented here constitutes the first investigation into the spatial and temporal variations of free-living and particle-attached bacterioplankton community structure in the South West lagoon of New Caledonia. This simultaneous approach is rare, notably in an oligotrophic coastal system (Schauer et al. 2000, 2003). For this purpose, we chose Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) fingerprinting since this technique offers a good compromise between sample throughput and phylogenetic resolution. It therefore allows the rapid comparison of microbial community structures associated with different water bodies.

VI.3. MATERIALS AND METHODS

VI.3.1. STUDY AREA AND SAMPLING STATIONS

Water samples were collected in the South West (SW) New Caledonian lagoon (2000 km^2), mostly in the vicinity of the city of Nouméa and its surrounding estuaries (Figure VI.1). The average SW lagoon depth is 21 m; the main channel is 25 m deep on average with the bay stations being shallower. Three deep passes bisect the barrier reef. The freshwater inputs are essentially due to the Dumbéa, Boulari and Pirogues rivers.

VI.3.2. SPATIAL SAMPLING

Water samples were collected during January 2003. Average (± SE) water temperature was 27.8 ± 0.1 °C. Sampling was performed along 5 different transects located near Nouméa City (Figure VI.1).

Sainte-Marie Bay is eutrophicated due to waste water outlets from the Sainte-Marie area. Grande Rade, around which the Nickel industry is located, is also a eutrophicated site The Dumbéa Bay is under terrigeneous influence from the Dumbéa River, and receives industrial and urban influences by the way of the Grande Rade. Boulari Bay is under terrigeneous influence

from the Pirogues River. The Western Shelf is frequently renewed by oceanic waters entering through the southern part (Douillet 1998). Away from the terrigeneous and anthropogenic influences, this part of the lagoon is generally considered as the most oligotrophic. Samples were also collected at a lagoonal (M33) and oceanic station (M41, located 2 miles seaward of the Dumbéa passage), (Figure VI.1).

Sample collection were collected from 3-m depth using acid washed 5-l Niskin bottles on 7, 8, 9, 10 and 14th of January 2003 for Sainte-Marie, Boulari, Dumbéa, Grande Rade and lagoon channel, respectively. Conductivity, temperature, *in vivo* fluorescence and turbidity profiles were recorded concurrently using a SeaBird SBE 19 profiler and Seapoint Fluorometer and Turbidity Meters, respectively. Water samples were kept in Niskin bottles until return to the laboratory within 1h30. All stations of the same transect were sampled within 1 hour, except for lagoon channel which required 2 hours due to the distance involved.

VI.3.3. TEMPORAL SAMPLING

Water samples for the temporal study were collected at station M33 (24 m deep) which is located in the main SW lagoon channel away from terrigeneous and anthropogenic influences and is representative of the Western Shelf (Jacquet et al. *in revision*). Sampling was achieved between 04/04/02 and 04/04/03 on a weekly or bimonthly basis. Sampling at weekly intervals was done during expected relative maxima of chlorophyll *a* concentrations (April – May and December-January; Dandonneau & Gohin 1984; Binet & Le Borgne 1996). Samples were collected at 5 depths evenly distributed along the water column (3, 7.2, 11.5, 15.8, and 20 m), were kept in Niskin bottles and were pooled at the laboratory within 1h30 after sample collection. As with the spatial sampling, conductivity, temperature, *in vivo* fluorescence and turbidity profiles were recorded concurrently using a SeaBird SBE 19 profiler.

VI.3.4. CHLOROPHYLL *a*, BACTERIAL ABUNDANCE AND PRODUCTION

Chlorophyll *a* (Chl.*a*) was determined fluorometrically following Holm-Hansen et al. (1965) on methanol extracts following filtration onto Whatman GF/F filters of replicate 300 ml samples.

Heterotrophic bacteria were enumerated by flow cytometry after SYBR green coloration (Marie et al. 1997). Water samples (1.5 ml) were preserved with 7.5 µl glutaraldehyde (Sigma Grade II) at room temperature in the dark for 15 min before storage in liquid nitrogen pending analysis. Enumeration was conducted on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson)

equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488nm and with a standard filter setup. Yellow fluoresbrite 0.95 µm beads were used as internal standards (size and fluorescence). The count rates per second never exceeded 500 optical events in order to avoid underestimation of particle abundance[11].

Bacterial production (BP) was estimated using [*methyl*-^{3}H] thymidine (TdR) incorporation into DNA (Fuhrman & Azam 1982). Duplicate 5-ml or 10-ml (oceanic station and M33) seawater samples were incubated at *in situ* temperature (± 1°C) with 15 nM TdR (final concentration; Amersham France, 2.9 TBq mmol^{-1}). After 60 min of incubation, incorporation was stopped by addition of buffered formalin (2% final concentration). Samples were then filtered onto 0.2-µm Nuclepore polycarbonate membranes. The vacuum was disconnected and filters received 15 ml ice-cold 5% TCA. After 15 min, vacuum was reapplied and the membranes were rinsed 3 times with 5 ml of ice-cold 5% TCA. Filters were placed in scintillation vials, hydrolyzed 30 min with 0.5 N HCl and received 4 ml scintillation cocktail. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting and the quench correction was made with external standards. Incorporation was calculated after subtracting a zero time blank. BP was expressed as pM h^{-1} which represents incorporation rate of ^{3}H-TdR. For temporal analysis, BP was normalized to 25°C using experimental $Q_{10\ (20\text{-}30°C)}$ determinations.

VI.3.5. T-RFLP BACTERIAL COMMUNITY ANALYSIS

Immediately after return to the laboratory, 2 liters of seawater were filtered at a pressure of < 20 mm Hg through 1.2 µm and then 0.2 µm cellulose filters (Micronsep, Osmonics Inc.), which were operationally defined to represent particle-attached and free-living bacteria, respectively. Immediately after filtration, membranes were stored in liquid nitrogen until analysis. Clogging may induce a bias when large volumes are filtered. The bias was estimated by comparing bacterial activity retained on 1.2 µm porosity Micronsep membranes (2 liters filtered) and 1 µm porosity Nuclepore membranes more conventionally used to separate particle-attached and free-living cells (see results). DNA was extracted from the membranes stored in liquid nitrogen with the UltraClean Soil DNA Isolation Kit, using the alternative lysis method (MoBio Laboratories Inc., USA). All extracted genomic DNA samples were stored at -20°C until further processing. Eubacterial 16S rRNA encoding genes were amplified by PCR using primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1489R (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3')

[11] Les données sont en attente du fait de problèmes techniques sur le cytomètre. Les valeurs d'abondance présentées dans le document sont obtenues par microscopie à épifluorescence et sujettes à caution.

fluorescently labeled with TET and HEX respectively (E.S.G.S. Cybergene group, France). A product with a length of approximately 1500 base pairs (bp) was obtained. The PCR reaction mixture contained 12.5 µl hot start Taq polymerase mix (Qiagen, Netherlands), 0.5 µl of each primer (20 µM), 1.5 µl $MgCl_2$ (2 nM final) and 1 µl (extractions on 1.2 µm filters) or 5 µl (extractions on 0.2 µm filters) of DNA, and sterile water to bring the reaction to a final volume of 50 µl. Samples were amplified in a PTC200 thermocycler (MJ Research, USA) at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min with a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were purified with the GFX PCR DNA purification kit (Amersham, U.K.). Then 50-100 ng of amplified 16S rDNA were digested in a 15 µl reaction volume containing 10 units of the restriction enzyme Hae III (New England Biolabs, USA). About 25-80 ng of the digested DNA from each sample were mixed with 18.5 µl of deionized formamide and 0.5 µl of Genescan 500 TAMRA size standard and then denatured at 94°C for 2 min and immediately chilled on ice prior to electrophoresis. Restriction fragments were separated by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 (Applied Biosystems). After an injection step of 10 s, electrophoresis was carried out for up to 30 min applying a voltage of 15 KV. Terminal restriction fragment sizes between 35 and 500 bp with heights > 50 fluorescence units were analyzed using GeneScan analytical software (ABI).

A several step analysis procedure (Dunbar et al. 2001) was performed to compare Terminal Restriction Fragments (T-RFs) profiles using a Visual Basic program. Profiles analysis is based on peaks heights (Grant et al. 2003). The first step consists of a standardization of DNA quantity between compared profiles. The sum of all peaks heights in each sample is calculated as an indication of the total DNA quantity represented by each profile. DNA quantity was standardized between profiles to the smallest quantity by proportionally reducing the height of each peak in larger profiles. The second step involves the elimination of the peaks below the baseline noise threshold (< 25 fluorescence units). After excluding these peaks, the new sum of peak heights of ≥ 25 fluorescence units was calculated in order to determine their relative proportion in each profile. The third step is the constitution of a table of T-RFs detected in each sample, including sizes in base pairs and their relative fluorescence intensity. T-RFs that differed by less than 0.5 bp in different profiles were considered identical and were clustered. All fragments within a cluster were assigned the average of the sizes within the cluster. Their relative proportion was summed. If, after these adjustments, some T-RFs of different samples differed by less than 3 bp, we considered them identical too.

VI.3.6. REPRODUCIBILITY OF T-RFLP FINGERPRINTING FROM COMPLEX BACTERIAL COMMUNITIES

Initial evaluations on the reproducibility of the T-RFLP approach were performed on triplicate samples from D01, M05 and M41 stations (Figure VI.2). These stations were chosen for their range of trophic characteristics (0.2-1.5 µg Chl.*a* l^{-1}). Triplicate samples were filtered on 0.2 µm (Nuclepore) filters and extracted as described above. Comparison of the different patterns for the same station revealed a high degree of similarity. We characterized this similarity with a Bray-Curtis Coefficient (see below for more details). The coefficient ranged between 81 and 97.5% between samples considered as identical (Figure VI.2). In that way, for the further interpretation of the coefficient between samples, we will consider two samples as identical when the coefficient is between 80 and 100%.

VI.3.7. DATA ANALYSIS

In order to compare the free-living and particle-attached assemblages, profiles of the same stations (spatial) or sampling dates (temporal) were normalized as described above. Tables were then transformed into binary matrices characterizing presence or absence of aligned fragments. A Jaccard's coefficient was computed for each table in order to compare the 2 fractions of each station (or sampling dates). Coefficient ranged from 0 (communities are totally dissimilar) to 1 (communities are totally similar).

In order to evaluate the reproducibility of the technique and to assess similarity of the samples within each transect (local spatial variations) and temporal variations of community we used hierarchical cluster analysis using group-average linking (UPGMA, Unweighed-Pair-Groups with Arithmetic Mean method, Sokal & Michener 1958). The analysis is based on Bray-Curtis similarity. Matrix coefficients ranged between 0 (samples are totally dissimilar) and 1 (samples are totally similar). The results of the hierarchical clustering are represented by dendrograms.

Ordinary analysis was used to identify a possible general pattern of bacterial community structure in the lagoon. We used Correspondence Analysis (CA) since it is considered more appropriate than Principal Correspondence Analysis (PCA) for analysis of ecological-data (samples-species) tables and may be applied to abundance data (ter Braak 1995).

We used Shannon's entropy H as an index of species diversity (Margalef 1958). The actual value of H depends on the base of logarithms used, which was in our case log 2 base (Legendre & Legendre 1998).

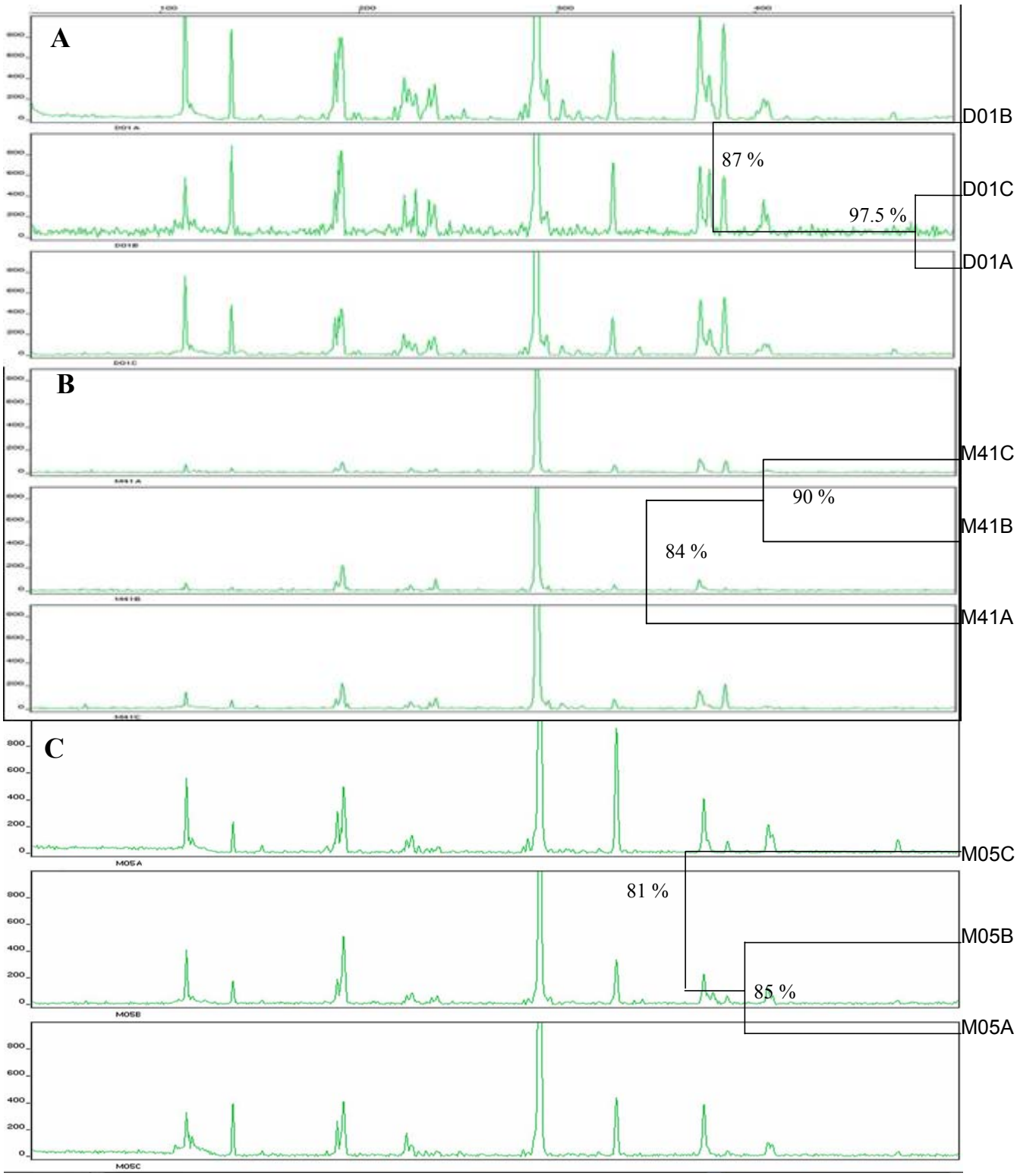


Figure VI.2 - T-RFs profiles of triplicate samples collected at stations D01 (A), M41 (B), and M05 (C). Similarity between triplicates is shown with UPGMA dendrograms using Bray-Curtis coefficient.

VI.4. RESULTS

VI.4.1. FREE-LIVING VS ATTACHED BACTERIA

Along coast-lagoon transects, average number of T-RFs is significantly higher for particle-attached bacteria (mean ± SE, 10.2 ± 0.9 T-RFs) than for free-living bacteria (7.9 ± 0.4 T-RFs, Student's t-test, $p < 0.05$). On average (± SE), Jaccard's coefficient is 0.36 ± 0.03, ranging from 0 (N12, Sainte Marie) to 0.67 (M08, Western Shelf) (Table VI.1).

At station M33, the average numbers of T-RFs are not significantly different between free-living bacteria (11 ± 1 T-RFs, $p = 0.2$) and particle-attached (12 ± 1 T-RFs). Average (± SE) Jaccard's coefficient is 0.32 ± 0.02, ranging from 0 (23 July) to 0.5 (22 May) (Table VI.1). Therefore free-living and particle-attached bacteria assemblages are dissimilar at about 64-68% both along eutrophication gradients and during the 1-year survey at station M33.

VI.4.2. SPATIAL VARIATIONS

VI.4.2.1. Physical, chemical and biological characteristics of the sampling sites

A total of 29 stations along 5 transects distributed around Nouméa City were sampled between the 7th and 14th of January 2003 to study the spatial differences of bacterial assemblages. Water temperature varied little among stations and differences along the same transect were less than 1°C in most cases (Table VI.2). Salinity varied within a small range, from 35.1 to 35.6 (average ± SE, 35.44 ± 0.02, n = 30) and varied little among transects. Turbidity ranged between 0.16 and 2.36 F.T.U and decreased significantly from coast to the lagoon.

Each bay transect displayed Chl.*a* concentrations that decreased from coast to the lagoon, and the bays receiving effluents from Nouméa City (Sainte-Marie and Grande Rade) showed stronger gradients than non-urbanized bays. The Western Shelf transect showed minor Chl.*a* variations and the oceanic station M41 presented a much lower value than the lagoonal values.

Bacterioplankton abundance averaged 0.51 ± 0.02 x 10^6 cell ml^{-1} for all stations. The values were relatively homogeneous along coast-lagoon transects and no significant difference was found between the average bacterial abundance at the different sites (*les données d'abondance par cytométrie de flux sont en attente pour confirmer ces valeurs*).

Table VI.1 - Jaccard's coefficient (J) between free-living and particle-attached bacteria community structure along coast-lagoon transects in January 03, and between 22/05/02 and 11/03/03 at station M33. Jaccard's coefficients may vary between 0 (samples are totally dissimilar) and 1 (samples are totally similar).

Transects			M33 station	
Transect	Station	J	Date	J
Sainte-Marie	N04	0.21	22/05/02	0.50
	N12	0.00	28/05/02	0.32
	N27	0.36	04/06/02	0.27
	N33	0.33	11/06/02	0.26
			18/06/02	0.33
Grande Rade	D01	0.26	26/06/02	0.41
	D16	0.40	09/07/02	0.20
			23/07/02	0.00
Dumbéa	D39	0.31	07/08/02	0.36
	D41	0.39	20/08/02	0.28
	D47	0.26	17/09/02	0.28
			01/10/02	0.35
Boulari	B05	0.44	14/10/02	0.46
	B08	0.50	29/10/02	0.39
	B16	0.44	12/11/02	0.11
	B18	0.43	04/12/02	0.31
	B26	0.43	10/12/02	0.22
	M03	0.36	20/12/02	0.42
	M05	0.47	03/01/03	0.29
	M08	0.67	07/01/03	0.40
			15/01/03	0.38
Western Shelf	M10	0.11	21/01/03	0.46
	M12	0.45	28/01/03	0.33
	M41	0.39	25/0203	0.26
			11/03/03	0.44

Table VI.2 - Physico-chemical and biological variables measured at 3 m depth along coast-lagoon transects, BA: Bacterial Abundance, BP: Bacterial Production

	Station	Date	Temperature	Salinity	Turbidity	BA	BP	Chl.*a*
			°C		*FTU*	*10^6 cell ml^{-1}*	*pM h^{-1}*	*µg l^{-1}*
Sainte Marie	N04	7-01-03	28.35	35.52	1.04	0.49	42.1	1.24
	N12	7-01-03	28.18	35.53	0.75	0.48	41.1	1.08
	N20	7-01-03	28.09	35.53	0.62	0.66	33.0	0.83
	N27	7-01-03	27.88	35.52	0.61	0.53	26.5	0.35
	N33	7-01-03	27.71	35.51	0.67	0.56	19.9	0.48
Grande Rade	D01	10-01-03	28.02	35.52	2.36	0.36	52.6	1.36
	D05	10-01-03	28.02	35.56	1.64	0.58	19.0	0.54
	D08	10-01-03	28.06	35.56	1.38	0.38	53.0	0.51
	D16	10-01-03	27.85	35.53	0.80	0.54	11.4	0.32
	D22	10-01-03	27.80	35.42	0.77	0.60	10.9	0.27
	D33	10-01-03	27.88	35.18	0.54	0.51	9.1	0.20
Dumbéa	D47	9-01-03	28.84	35.38	1.37	0.47	21.2	0.47
	D46	9-01-03	27.97	35.24	0.56	0.45	16.7	0.37
	D45	9-01-03	28.49	35.12	0.98	0.64	8.8	0.26
	D39	9-01-03	28.08	35.43	0.66	0.53	9.8	0.26
	D41	9-01-03	27.75	35.45	0.49	0.52	9.4	0.19
	M05	9-01-03	27.26	35.44	0.29	0.44	6.7	0.18
Boulari	B03	8-01-03	27.90	35.47	1.68	0.46	11.7	0.67
	B05	8-01-03	27.79	35.44	1.26	0.53	12.0	0.59
	B08	8-01-03	27.85	35.52	1.54	0.40	12.5	0.62
	B16	8-01-03	27.55	35.49	0.87	0.77	9.8	0.38
	B18	8-01-03	27.64	35.50	0.94	0.61	14.4	0.40
	B26	8-01-03	27.48	35.47	0.35	0.49	9.4	0.25
Western Shelf	M03	14-01-03	27.85	35.48	0.33	0.53	7.8	0.28
	M05	14-01-03	27.44	35.44	0.22	0.41	5.4	0.17
	M08	14-01-03	27.24	35.37	0.35	0.37	9.3	0.25
	M10	14-01-03	27.16	35.34	0.25	0.45	5.0	0.21
	M12	14-01-03	27.23	35.35	0.24	0.40	8.3	0.24
	M41	14-01-03	27.07	35.33	0.16	0.58	0.8	0.11
	M33	7-01-03	27.29	35.41	0.18	0.56	8.7	0.17

Table VI.3 - Community structure of free-living bacterioplankton along coast-lagoon transects. T-RFs (bp): Terminal Restriction Fragments (base pairs), the numbers represent the relative fluorescence in %. N: number of T-RFs, H': Shannon index in log2, Occurrence % is detected T-RF / profiles number × 100.

	T-RFs (bp)	63	73	112	162	170	187	191	196	226	230	232	236	239	242	253	291	303	310	319	386	N	H'
Sainte Marie	N04	10		9							8			10	23		17				23	7	2.7
	N12			10		12	27				31						9	11				6	2.4
	N20											Sample lost											
	N27			10		10	37				33						10					5	2.1
	N33			17			27				35						21					4	1.9
Grande Rade	D01			20		9	36				13						22					5	2.2
	D05			31			36										33					3	1.6
	D08											Sample lost											
	D16			11		15	31		12		15						16					6	2.5
	D22											Sample lost											
	D33											Sample lost											
Dumbea	D47		10	20		12	29				17						12					6	2.5
	D46			17		13	34				16						20					5	2.2
	D45											Sample lost											
	D39			18			8	8		11							37		11	8		7	2.5
	D41			25			9	9		10							30		8		8	7	2.6
	M05			32			13			14							31		11			5	2.2
Boulari	B03			31			41				28											3	1.6
	B05			12										21			31	13			22	5	2.2
	B08			8				9			9		11	20			24				19	7	2.7
	B16										15			23			24	13			25	5	2.3
	B18			29			34				17						20					4	1.9
	B26			10	15				10					10			21	25			9	7	2.7
Western shelf	M03			10	10	15	24		12		15						15					7	2.7
	M05		10	13		12	27				20						18					6	2.5
	M08			11		12	22		9		22	10					15					7	2.7
	M10						27		14		25					14	20					5	2.3
	M12			23			10	9			13						33		12			6	2.4
	M41			15		15	37				16						17					5	2.2
	M33			50				10			11						30					4	1.7
occurrence	%	4	8	88	8	40	76	16	20	12	72	4	4	20	4	4	92	16	16	4	24		

The Sainte Marie and Grande Rade Bays, which receive effluents from Nouméa City, showed higher average bacterial production than the other bays (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 5$) and displayed significant decreasing coast-lagoon gradients (Spearman Rank Correlation, $p < 0.001$, $p < 0.01$, for Sainte Marie and Grande Rade Bays, respectively). No gradient of bacterial activity was found along the Boulari Bay and Western Shelf transects, although BP did decrease along the Dumbéa transect ($P < 0.001$, Table VI.2). The oceanic station M41 presented extremely low bacterioplankton production rates compared to lagoon values (0.8 ± 0.0 pM h^{-1}).

VI.4.2.2. Quantitative and qualitative aspects of the spatial distribution of attached and free-living bacteria

T-RFs

The number of T-RFs obtained per station following Hae III digestion varied between 3 and 7 (average value 5.5 ± 0.2 T-RFs) for free-living bacteria and between 3 and 10 (average value 6.2 ± 0.4 T-RFs) for particle-attached bacteria. In total, 20 T-RFs were obtained for free-living bacteria and 33 for attached bacteria (Tables VI.3 and VI.4) of which six (30%) free-living and 17 (52%) attached T-RFs appeared at only one station. The most frequently occurring T-RFs (112 bp and 291 bp) are dominant in both free-living and attached communities. Indeed, when detected (23 out of 25, and 22 out of 25 cases for free-living and attached communities, respectively) 112 bp T-RF represents on average 17 ± 3 % of particle-attached T-RFs and 19 ± 3 % of free-living T-RFs. 289-291 bp T-RF (detected in 24 out of 25 and 23 out of 25 cases for free-living and attached communities, respectively) contributes on average at 24 ± 2 % of particle-attached and 22 ± 2 % of free-living T-RFs.

Shannon index computed on each profile (Tables VI.3 and VI.4) varied in a smaller range for free-living bacteria (1.6-2.7) than for particle-attached bacteria (1.4-3.2).

Table VI.4 - Community structure of particle-attached bacterioplankton along coast-lagoon transects. Abbreviations as in Table V.3

	T-RFs (bp)	36	49	55	71	73	76	112	151	187	191	196	217	225	228	236	239	242	247	249	250	251	289	303	310	315	338	371	378	386	400	435	462	472	N	H'
Sainte Marie	N04		39				47																											15	3	1.4
	N12			12	39									7													6	26					10		6	2.2
	N20																	Sample lost																		
	N27							12		14	8				9		9		9				18						22						8	2.9
	N33							7		13	8			9		7	9		18				20						10						9	3.1
Grande Rade	D01							9			9						23				8		31							9		11			7	2.6
	D05																	Sample lost																		
	D08							6		15			9				22				6		11			7			11	6	7				10	3.2
	D16							12		11					7		25						29						7	9					7	2.6
	D22																	Sample lost																		
	D33							12		25	14					12	19						18												6	2.5
Dumbea	D47									9						11	20		10				18						32						6	2.4
	D46																	Sample lost																		
	D45							45		30													25												3	1.5
	D39							10		19	7			12		7	12		7				25												8	2.9
	D41							14		29	10			10			9						28												6	2.4
	M05							45						14									32	9											4	1.8
Boulari	B03																	Sample lost																		
	B05							40		19	8												33												4	1.8
	B08							45		8	8			9									30												5	1.9
	B16							13		9	15			8					20				23						11						7	2.7
	B18					12		17	8	14	10			9					15				14												8	3.0
	B26							24		9	7			6									16	39											6	2.3
Western Shelf	M03					8		10		7	9				15		27						17						7						8	2.8
	M05							12		0	8						26		8	6	8	6	20						6						10	2.9
	M08							17		12		20											51												4	1.8
	M10							14									33	29					24												4	1.9
	M12							11									58						20							12					4	1.6
	M41							8			7	13					30			8			25		9										7	2.6
	M33	38						15			14					8				10			15												6	2.4
occurrence %		0	4	4	4	8	4	84	4	68	56	8	4	36	12	16	56	4	28	8	12	4	88	8	4	4	4	4	32	16	4	4	4	4		

Patterns of community composition along the coast-lagoon transects

UPGMA analysis was performed on the free-living and particle-attached bacteria for each transect (Figure VI.3). M33 station was not considered in these analyzes as it is far away from each transect. As previously mentioned, the interpretation of the dendrograms is based on the reproducibility test. An 80-100% similarity coefficient between two samples suggests that they are identical using our procedure since similarity between replicates is in the same range.

The Western Shelf transect showed very similar free-living communities (> 70% similarity) between all stations except one. Indeed, station M12 (Dumbéa pass) differs from the others with only 40% of similarity. No clear pattern was evident for the particle-attached bacteria.

In Boulari Bay, UPGMA dendrogram analysis also indicates patterns of community structure as a function of the distance to the coast. The free-living communities of this bay show a clear trend of decreasing similarity between stations with increasing distance from the coast. B03 station was removed from the analysis due to the low intensity fluorescence of the T-RFLP profile. Particle-attached bacterial communities show a high degree of similarity between head of the bay stations (B05 and B08, 74% of similarity) and between mouth of the bay stations (B16 and B18, 69% of similarity). However, station B26, the most distant from the coast, appears more closely related to head of bay stations than B16 and B18.

In Dumbéa Bay, the free-living assemblages can be divided into two groups with stations at the head of the bay (D46 and D47) showing 79% of similarity in one group, and stations at the mouth of the bay (D39, D41 and M05) showing 84% of similarity in the other. Regarding particle-attached bacteria, the bacterioplankton community of D47 (head of bay) presents only 47% similarity with the other stations while the other ones are similar at more than 60%.

In Grande Rade Bay, the T-RFLP analysis was not successful on all stations. Out of the 6 stations sampled, it only worked for 3 of the stations for free-living assemblages and for 4 stations for the particle-attached bacteria. Nevertheless, we can still observe that free-living communities of these 3 stations are rather similar with more than 66% similarity. The particle-attached bacterial communities are more dissimilar, except for D01 and D16, that present 77% similarity.

Sainte-Marie Bay free-living bacterioplankton presents an important similarity (79%), for stations N12, N27 and N33, whereas inner station N04 is very different (30% similarity) from the others. Attached bacterioplankton shows clear differences between the inner stations N04 and

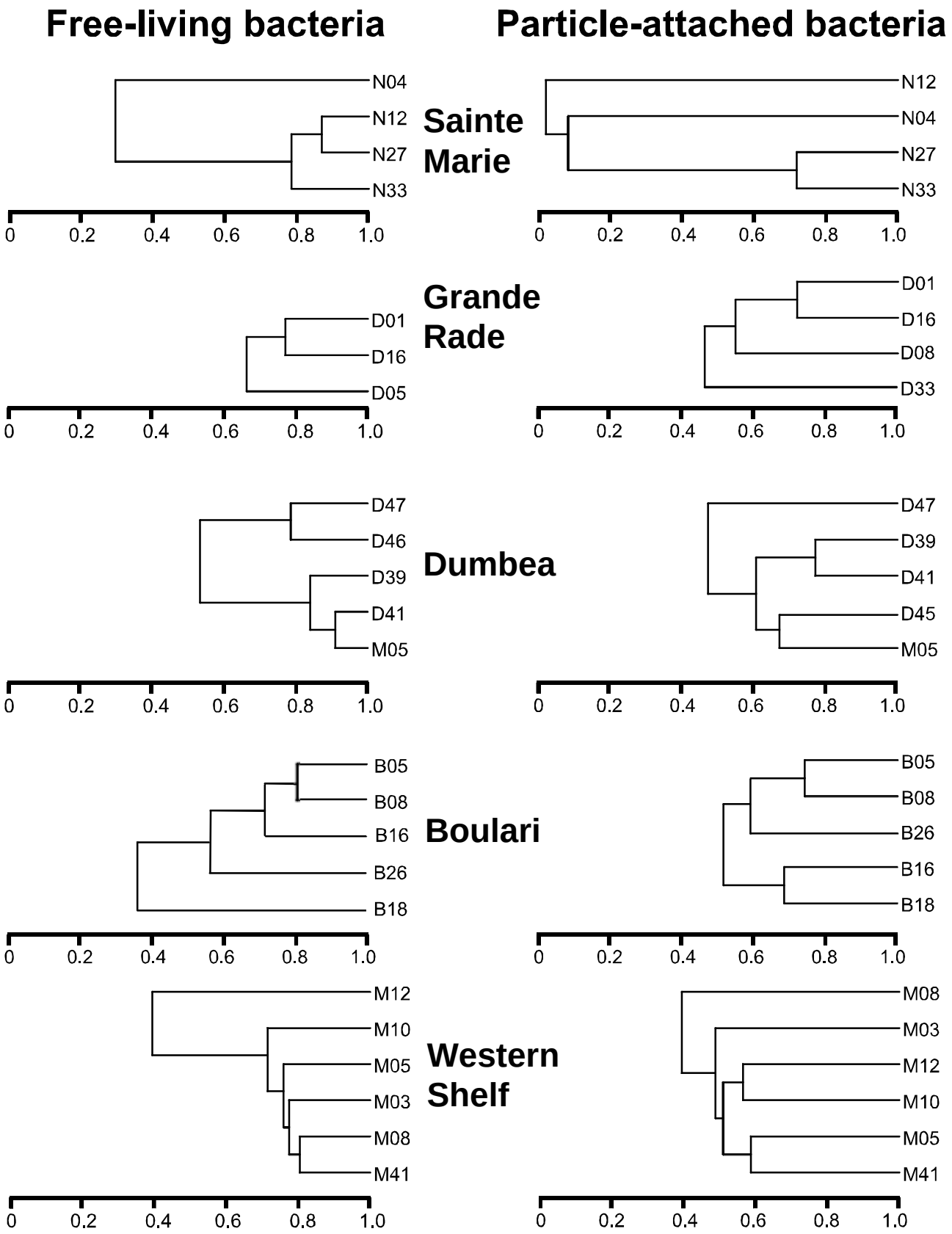


Figure VI.3 - UPGMA dendrogram based on Bray-Curtis similarity. T-RFLP samples for free-living (A) and for particle-attached (B) bacteria from each transect.

N12 and the others, whereas the bay mouth stations N27 and N33 present a 72% similarity. Therefore, within most of the bays, significant differences can be observed for microbial community composition in parallel to significant gradients of phytoplankton biomass and bacterioplankton production.

General pattern

In order to identify a possible general pattern of community structure among the different stations, a correspondence analysis (CA) was performed using normalized heights of terminal restriction fragment peaks as input variables. For free-living bacteria, the first two principal components, axis 1 and axis 2, explained 26 and 16%, respectively, of the total variation in the peak height (Figure VI.4). CA revealed three different groups. Group 3 is composed essentially of the Boulari stations with the additional presence of N04. We were unable to find any common trophic or physical character in the water samples from the two other groups.

The same analysis was performed on particle-attached bacteria. The first two principal components, axis 1 and axis 2, explained 21 and 20%, respectively, of the total variation in the peak height (Figure VI.5A). Axis 1 clearly differentiates N04 (Sainte Marie) and axis 2, N12 (Sainte Marie) from the other stations. These two stations differ from the others in two ways: (1) of the 17 T-RFs that appeared only once, 9 belong to these two stations; and (2) these two stations lack the most frequently occurring T-RFs 112 bp and 289 bp. We performed the same analysis without these two stations (Figure VI.5A). The first 2 principal components, axis 1 and 2 explained 16 and 14%, respectively, of the total variation in peak height. CA clearly separated M33 and B26,

characterized respectively by the T-RFs 36 bp and 303 bp, from the other ones. Two other groups may be defined; each of which is characterized by 9 T-RF. Group 1 includes the most frequently occurring T-RFs 112 bp and 289 bp. We found no common trophic or physical character in the water samples from these two other groups. Therefore, these global analyses of bacterial community structure do not show any clear spatial pattern.

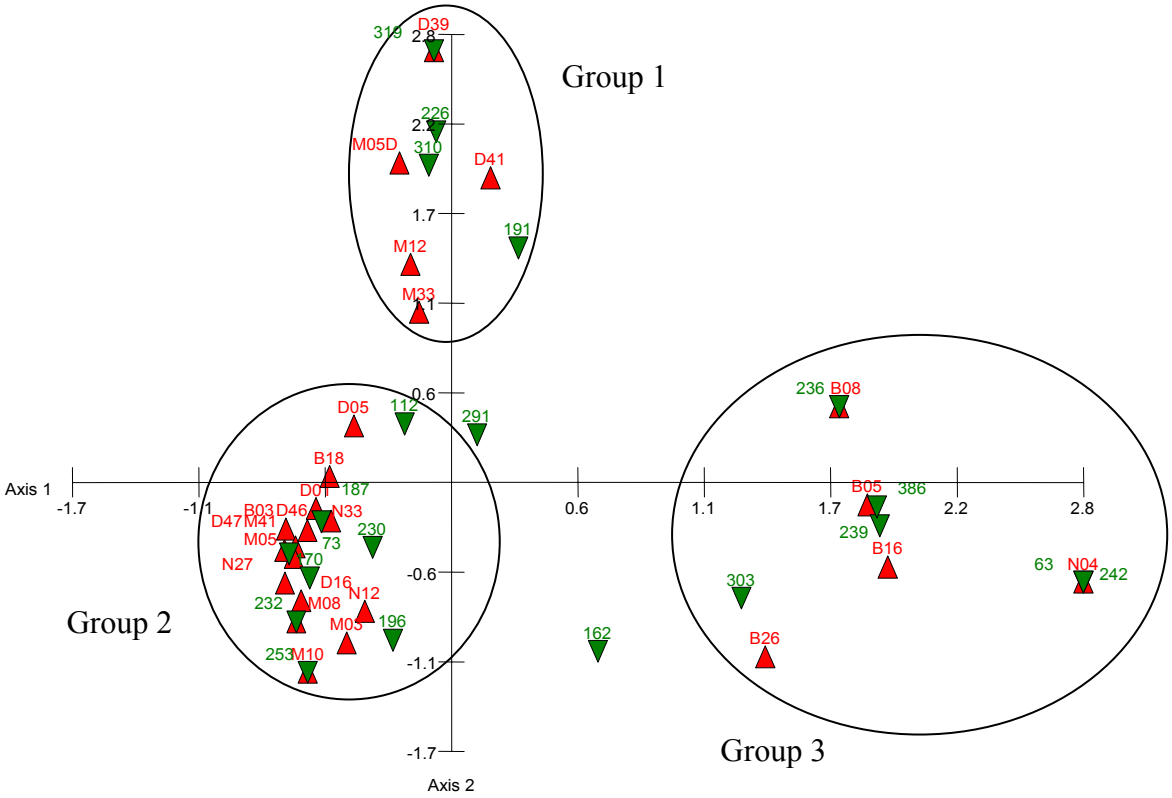


Figure VI.4 - Correspondence analysis on T-RFLP profiles of free-living bacterioplankton along coast-lagoon transects. Symbol ▲ for stations and ▼ for T-RFs.

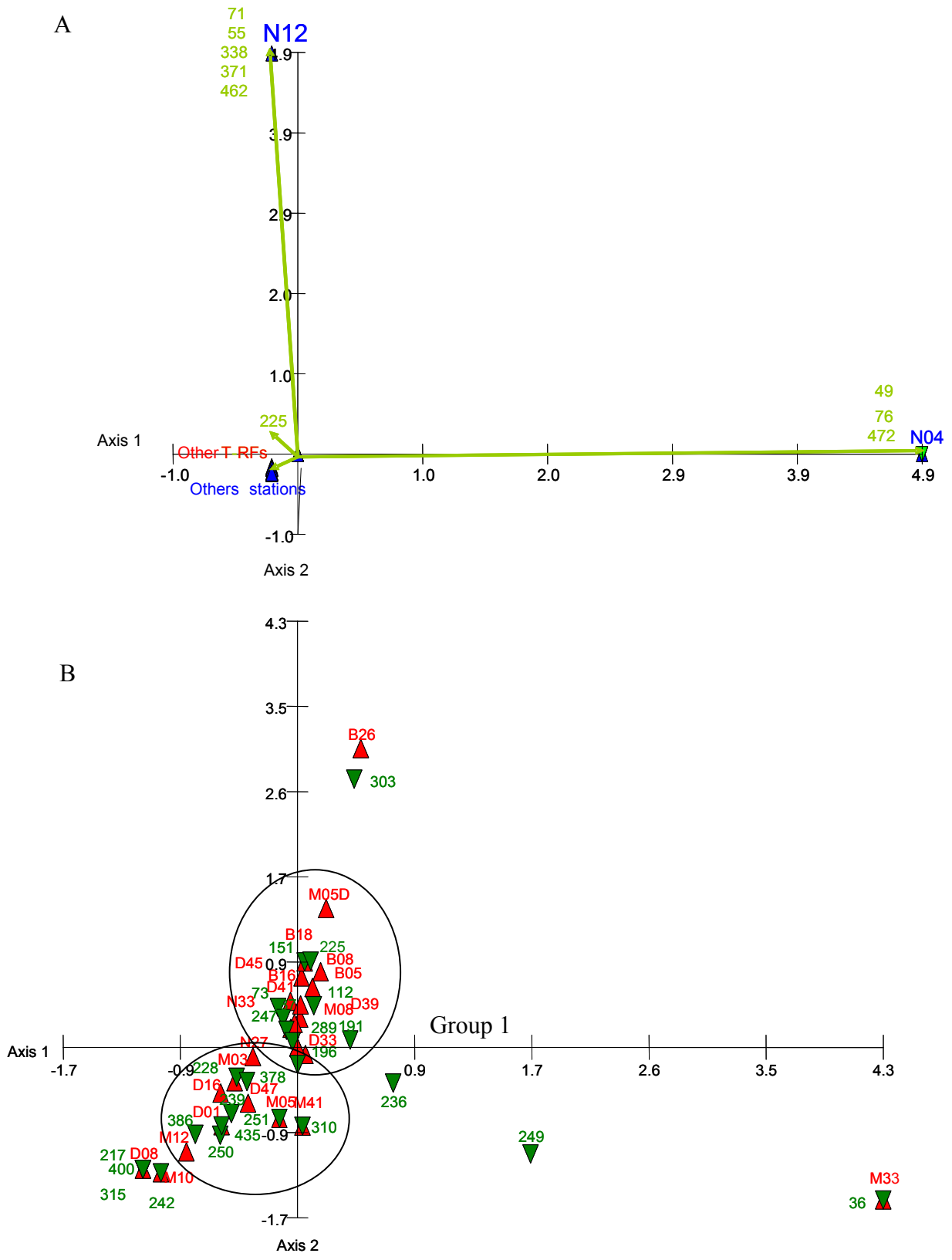


Figure VI.5 - Correspondence analysis on T-RFLP profiles of particle-attached bacterioplankton along coast-lagoon transects. (A): all stations, (B): without N04 and N12 stations. Symbol ▲ for stations and ▼ for T-RFs.

VI.4.3. TEMPORAL VARIATIONS

VI.4.3.1. Physical, chemical and biological characteristics of the survey site

Temperature ranged between 21.2 and 27.8 °C, and showed a seasonal variability with decreasing values between April and September which thereafter increased until January (Figure VI.6A). Salinity in station M33 showed little variation with a minimum (35.1) from March to June and a maximum (35.7) from October to December, with an average salinity of 35.41 ± 0.02 for the study period (Figure VI.6A). Turbidity varied little between 0.2 and 0.5 F.T.U., average 0.40 ± 0.01 F.T.U., and exhibited no clear seasonal trend (Figure VI.6B).

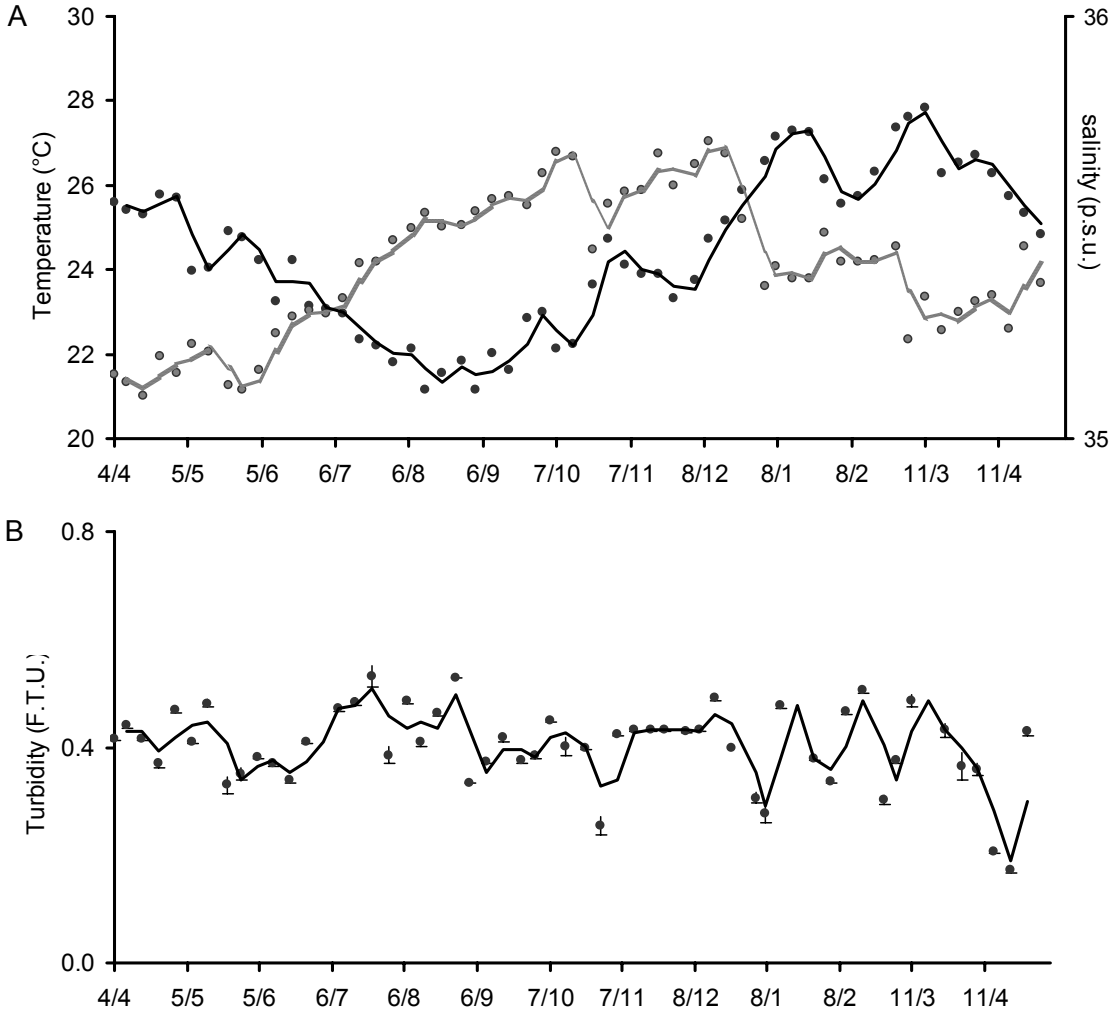


Figure VI.6 - (A) Temperature (black line), salinity, and (B) turbidity averaged over the whole water column at station M33 between April 2002 and April 2003. Black lines represent moving averages on 2 weeks.

Chl.*a* ranged between 0.15 µg l^{-1} and 0.47 µg l^{-1}. Relative maxima were observed in April-May 02 and March-April 03 (Figure VI.7A) in agreement with temporal variations observed on longer time-series (Binet & LeBorgne 1986) in New Caledonia Southwest Lagoon. Bacterial production showed a much larger variation and ranged between 0.11 and 6.84 pM h^{-1} (Figure VI.7B). From April until December 2002, BP was always less than 2 pM h^{-1}; thereafter, BP increased sharply up to 6.8 pM h^{-1} in January 2003 and then decreased a few days later. Bacterial production was positively correlated with Chl.*a* concentration ($p < 0.01$, $n = 35$).

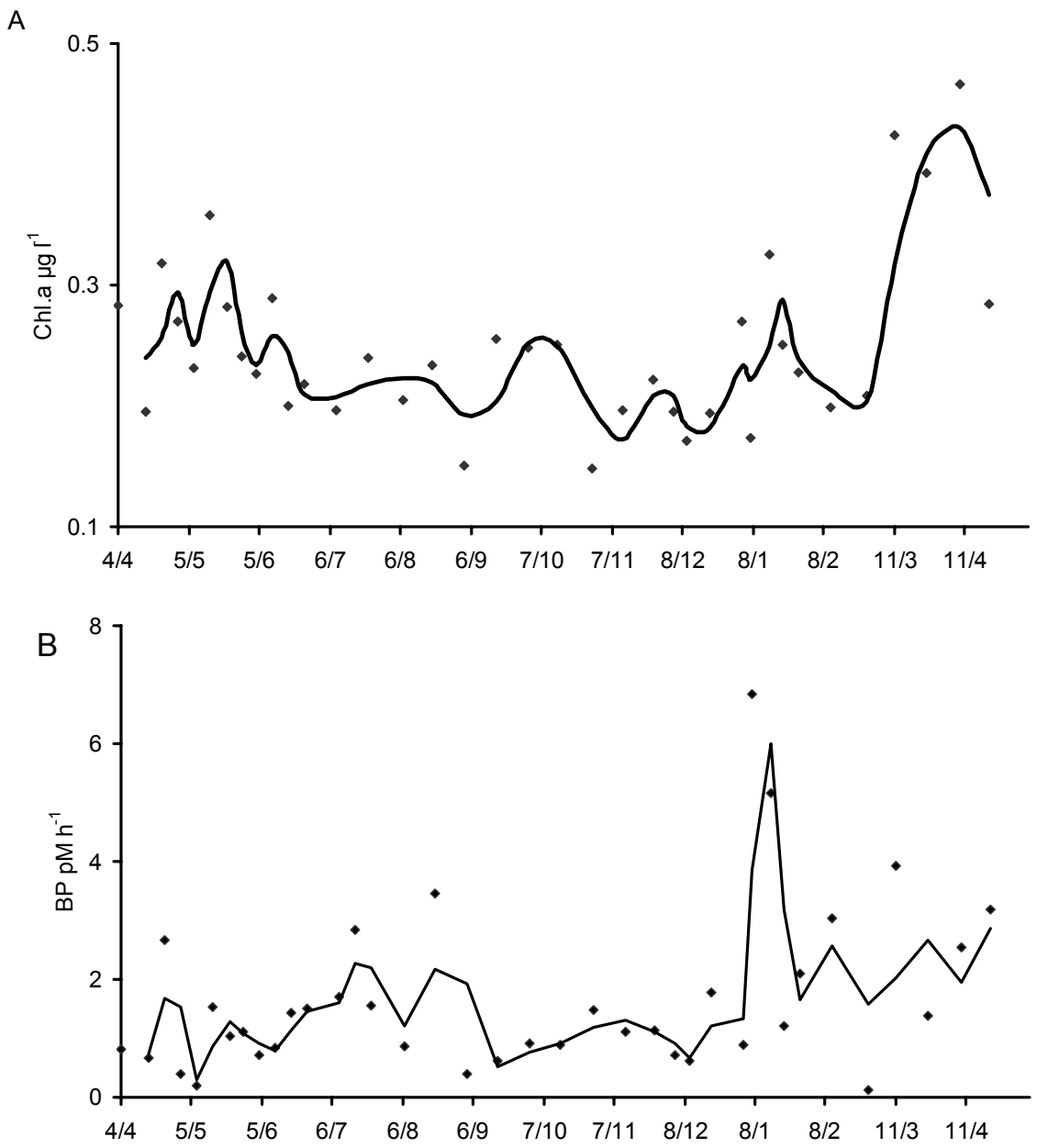


Figure VI.7 - (A) Chlorophyll *a* and (B) bacterial production averaged over the whole water column at station M33. Black lines represent the moving averages on 2 weeks.

Table VI.5 - Community structure of free-living bacterioplankton at M33 station. Abbreviations as in Table VI.3.

	T-RFs	50	64	73	112	166	170	187	191	193	227	239	242	251	290	303	310	319	348	377	386	N	H'
14/05/02					9			20	10		11	9	14		20					7		8	2.9
22/05/02					40			12	9		11				27							5	2.1
28/05/02					54						9				37							3	1.3
04/06/02					42						8				41	9						4	1.7
11/06/02					41			19	8						33							4	1.8
18/06/02					46			10	7						27				9			5	1.9
26/06/02					14			9	18		8			19	22					10		7	2.7
09/07/02				12	22			13	11		10			16	16							7	2.8
23/07/02		11	43			46																3	1.4
07/08/02					53										34	12						3	1.4
20/08/02					44						7				41						8	4	1.6
03/09/02											sample lost												
17/09/02					48			8	9		8				27							5	1.9
01/10/02					45			9	12						33							4	1.7
14/10/02					50			14	9						27							4	1.7
29/10/02					51				9		10				31							4	1.7
12/11/02					60						11				29							3	1.3
25/11/02					38			7	15						39							4	1.7
04/12/02					54				15						31							3	1.4
10/12/02					54			8	11						27							4	1.6
20/12/02					33			9	10		7				29		5	7				7	2.5
03/01/03					43				8		11				31					7		5	2.0
15/01/03					18			13							37		19				13	5	2.2
21/01/03					31				10						37	22						4	1.9
28/01/03					23		5	6	9						49						7	6	2.1
11/02/03											sample lost												
25/02/03					31				9	10					33			7			10	6	2.3
11/03/03					19		21		12						47							4	1.8
occurrence %		4	4	4	96	4	8	54	73	4	46	4	4	8	96	12	8	8	4	12	15		

VI.4.3.2. Quantitative and qualitative aspects of the temporal distribution of attached and free-living bacteria

T-RFs

The number of T-RFs following Hae III digestion ranged between 3 and 8 (average 4.7 ± 0.3 T-RFs) for free-living bacteria and between 2 and 13 (average 7.7 ± 0.5 T-RFs) for particle-attached bacteria (Tables VI.5 and VI.6).

In total, 20 T-RFs were obtained for free-living bacteria and 32 for attached bacteria. Eight (40%) free-living and 10 (31%) attached T-RFs appeared only once in the 26 samples collected over the year. Four T-RFs of free-living bacteria (112 bp, 187 bp, 191 bp and 291 bp) and 5 T-RFs of attached bacteria (112 bp, 188 bp, 191 bp, 240 bp and 291 bp) appeared in more than 50% of the samples, similar to the results from the transects. Four of the T-RFs appear to be specific to free-living bacteria and 16 T-RFs to attached bacteria, whereas, the predominant T-RFs are common to both fractions.

The most frequently occurring T-RFs (112 bp and 291 bp) are dominant in both fractions. Indeed, 112 T-RF represents on average 39 ± 3 % of the free-living fractions and 14 ± 3 % of the amplified rDNA in the particle-attached fraction. When it is present (in 25 out of 27 samples and 23 out of 25 samples for free-living and attached communities, respectively) 291 bp T-RF represents, on average 32 ± 2 % in the free-living communities and 20 ± 2 % of the amplified rDNA in the particle-attached communities.

Patterns of community composition

Patterns that are determined as being similar by the UPGMA analysis are indicated with the same letter in Figure VI.8. Regarding free-living assemblages, 26 analyses were successful. Using a 50% similarity criterion, 3 different T-RFs profiles could be observed during the year. Profile *b* (56% minimum similarity) was largely dominant throughout the year (22 out of 26 samples). Profile *c* (60% minimum similarity) appeared 3 times and is characterized mostly by 73 bp, 239 bp, 242 bp, 251 bp, 377 bp T-RFs. Profile *a* was observed only on July 23rd and was atypical comprising of 50 bp, 64 bp, 166 bp T-RFs and none of the most predominant ones.

Regarding particle-attached assemblages, over the 25 successful analyses, using the same similarity criterion than for free-living assemblages (50%), 9 different T-RFs profiles could be observed during the year.

Table VI.6 - Community structure of particle-attached bacterioplankton at M33 station. Abbreviations as in Table VI.3.

T-RFs	62	73	108	112	161	169	170	181	188	191	196	202	217	229	231	238	240	242	250	252	257	259	291	294	303	310	318	379	386	399	400	434	N	H'
14/05/02																sample lost																		
22/05/02				14													16						50						21				4	1.8
28/05/02		10		20		7	10		22	4					13								13										8	2.8
04/06/02												9		17			14						21		15				23				6	2.5
11/06/02				7			7		47		5				13								21										6	2.1
18/06/02		6		29		6	7		26						11								15										7	2.5
26/06/02				36		5	8		26						10								15										6	2.3
09/07/02								5	67	6											16	6											5	1.5
23/07/02				10	13					6	10			5		4	8						17		21				8				10	3.1
07/08/02	9		4	8								4		7			27						13	9	5				13				10	3.1
20/08/02									51						49																		2	1.0
03/09/02				8		4	8		45						21								9		4								7	2.3
17/09/02		4		7						5				7	9		12	15					13	5	4			5	14				12	3.4
01/10/02				51					6	8	4			7									24										6	2.0
14/10/02		7		10					13	8	5			14	5		17						16					7					10	3.2
29/10/02		5		11						10				7			19		11	13			18					5					9	3.0
12/11/02	19				17						43												21										4	1.9
25/11/02																sample lost																		
04/12/02		5		8						5	7						21	16		6			15					6	9				10	3.1
10/12/02				11						12							17	14					26		5				7			7	8	2.8
20/12/02				8						7	14						7	10		6			30			10	7						9	2.9
03/01/03				6					5					6	7		7	12					20					27	10				9	2.9
15/01/03				5					11	4			10	6			19		5				11				6	9	5	5	5		13	3.5
21/01/03				7						6				5			50			9			12		5				6				8	2.4
28/01/03				16						8							9	17		12			38										6	2.4
11/02/03																sample lost																		
25/02/03									14								10	17		9			16					28	6				7	2.7
11/03/03		6		8					18					5	6		8	15					18					10	7				10	3.2
occurrence %	8	28	4	80	8	16	20	4	52	52	28	8	4	44	40	4	52	32	8	24	4	4	92	8	28	4	8	32	48	4	4	4		

	Free-living	Particle-attached
14/05/02	c	-
22/05/02	b	j
28/05/02	b	g
04/06/02	b	j
11/06/02	b	g
18/06/02	b	g
25/06/02	c	g
09/07/02	c	e
23/07/02	a	i
07/08/02	b	h
20/08/02	b	e
03/09/02	-	g
17/09/02	b	l
01/10/02	b	f
14/10/02	b	l
29/10/02	b	l
12/11/02	b	d
25/11/02	b	-
04/12/02	b	l
10/12/02	b	l
20/12/02	b	k
03/01/03	b	l
15/01/03	b	l
21/01/03	b	h
28/01/03	b	k
25/02/03	b	l
11/03/03	b	l

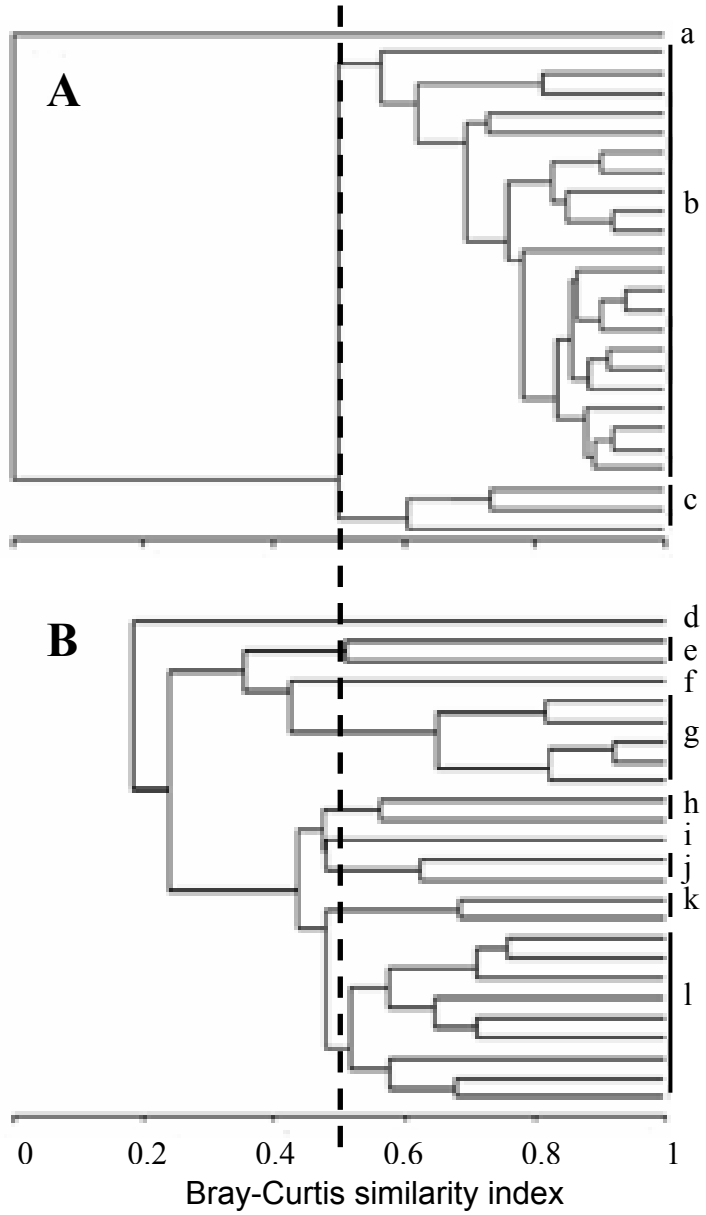


Figure VI.8 - UPGMA dendrograms based on the Bray-Curtis similarity of free-living bacteria (A), and particle-attached bacteria (B). Similar profiles are defined at 50 % similarity (dotted line) and are identified by the same letters.

Profile *l* (52%) is dominant, appears in 9 out of 25 samples and is characterized mostly by T-RFs 112 bp, 240 bp, 291 bp, 379 bp, and 386 bp. Profile *g* (65% similarity) appeared 5 times. Other profiles appeared only once or twice throughout the year. Sixteen (h, i, j, k, l groups) out of 26 samples present 44% of average similarity. Profile *d* was observed only on November 12th but did not present any particular T-RFs.

In order to characterize temporal bacterioplankton community changes the Bray-Curtis similarity index was calculated over successive samplings (Figure VI.9).

For the free-living assemblages, similarity between two successive samples is often more than 50%. It confirms that the profile from July 23rd was atypical and without any similarity to the samples collected immediately before or after. Without this extreme case, similarity between community profiles from two successive samplings ranged between 0.49 and 0.92 and was on average 0.69 ± 0.05.

Regarding particle-attached assemblages, similarity between community profiles from two successive samplings averaged 0.42 ± 0.05 and was less than 0.5 in 15 out of 24 cases. Thus the variability index is more important than for free-living assemblages and varied from 0.13 to 0.91 over the period of one month (from 28/05 to 26/06).

Therefore, community profile analyzes revealed no seasonal trend of bacterial community structure. Free-living consortia are characterized by an important stability of community profiles over the year, with few exceptions. Conversely, the attached bacterioplankton is characterized by important short term variations of community structure.

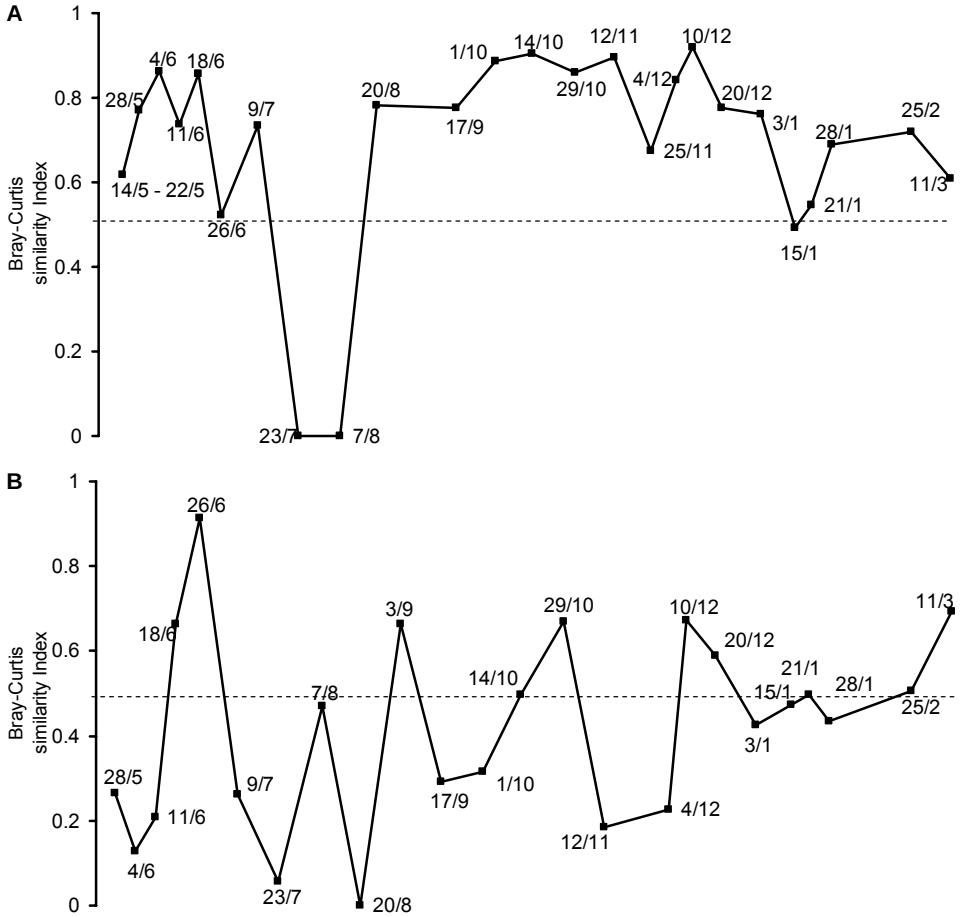


Figure VI.9 - Bray Curtis similarity index between two successive samplings at station M33 for free-living (A) and particle-attached (B) bacterial communities. Each point represents the similarity index between the date at the point and the date before. Dotted lines represent 50 % similarity.

Diversity

Shannon diversity index does not reveal the presence of a seasonal trend (Tables VI.5 and VI.6). The variability of the Shannon index between two successive samples is on average more important for particle-attached (1.4 ± 0.1 fold) than for free-living assemblages (1.2 ± 0.1 fold, ANOVA, $p < 0.001$).

VI.5. DISCUSSION

VI.5.1. DIFFERENCES BETWEEN FREE-LIVING AND PARTICLE-ATTACHED BACTERIA

Our results indicate that there are differences in the species composition of free-living and particle-attached bacteria in the South West lagoon of New Caledonia. Significant differences in the community compositions between these two fractions are generally reported (Bidle & Fletcher 1995, Acinas et al. 1997, Acinas et al. 1999, Crump et al. 1999, Moeseneder et al. 2001) with few exceptions (Hollibaugh et al. 2000). The differences in community structure between free-living and particle-attached fractions suggest that different factors control these two communities. Of which, resources for bacterial growth are important and differ considerably between organic particles and free water (Long & Azam 2001). Moreover, it is well accepted that organic particles offer a niche that invites specialization (Giovannoni & Rappé 2000) and that this favors the development of a community composition distinct from that encountered in free water. Additionally, these differences suggest that bacterioplankton community profiles for free-living and attached fractions should be analyzed separately in order to assess spatial or temporal variations.

Our results suggest that attached bacteria have a greater diversity when compared to that of free-living bacteria and that this was true for the transect stations but not for the main lagoon channel station, M33. Indeed, we showed that the number of T-RFs was significantly higher for particle-attached bacteria (10.2 ± 0.9) than for free-living (7.9 ± 0.4, $P < 0.05$) along the transects sampled. Acinas et al. (1997) have shown the opposite in Western Mediterranean waters. However methodological biases inherent to fingerprinting techniques and contamination of bacteria from one fraction to the other one may complicate interpretation. In most studies the community composition of bacteria attached to particles is operationally defined from DNA extracted from water samples retained on 1 µm (or larger) porosity membranes (DeLong et al.

1993, Acinas et al. 1997, Crump et al. 1999, Moeseneder et al. 2001). In this study, we used cascade filtrations onto 1.2 µm and 0.2 µm porosity membranes. In order to appreciate if clogging due to filtration of large volumes could represent an important bias in this attempt to distinguish free-living and attached community compositions, we compared bacterial abundance in the filtrate after having filtered 2l onto 1.2 µm membranes to that of the filtrate after filtration of a smaller volume (40 ml), in order to minimize clogging, on to 1 µm porosity Nuclepore membranes. Comparison of two samples from different trophic statuses (M33: $0.70 \pm 0.02 \times 10^6$ cell ml^{-1}, N12: $1.05 \pm 0.02 \times 10^6$ cell ml^{-1}) showed that 14.3 and 15.3% of total bacteria were retained when 40 ml are filtered onto 1 µm Nuclepore membranes, respectively for M33 and N12 samples. When 2 liters are filtered onto 1.2 µm porosity membranes, these proportions increase to 29.5 and 36.2%, respectively. We therefore slightly overestimated the «attached» cell number by 15 (M33) and 21% (N12) of «free» bacterial cells as defined by the community passing 1 µm Nuclepore membranes. Since we applied a low vacuum during the filtration procedures, it is unlikely that particle-attached bacteria contaminated the free-living fraction; we therefore consider that clogging of the filters could have lead to the possible contamination of the attached fraction by free-living bacteria. The small difference between attached and free-living T-RFs along the transects is therefore to be considered with caution. Nevertheless, this potential bias should however not alter the significance of the differences in community composition between the two fractions. Indeed, possible inter-contaminations suggest that differences already shown should be considered as conservative estimates.

VI.5.2. SPATIAL VARIATIONS

Very little is known about bacterial community structure in the water column of coral reef environments. Studies in such environments have tended to deal with coral associated-bacteria (Rohwer et al. 2001, 2002) or on bacteria suspected to be implicated in certain coral diseases (Frias-Lopez et al. 2002). To our knowledge, only one study deals with the composition of bacterial communities in coral reef lagoons (Tuamotu, French Polynesia, Hollibaugh et al. 2002) and only one other was performed in a subtropical coastal area (Moreton Bay, Australia, Hewson & Fuhrman 2004) using fingerprinting techniques. Hollibaugh et al. (2002) compared 10 lagoons of the Tuamotu Islands using DGGE. The microbial populations of some lagoons were very similar, despite differences in activity, whereas others had distinct populations, dominated by only a few bands. Seasonality and water exchange (and variables affected by exchange) appeared to be the major factors controlling community composition in these lagoons. Hewson &

Fuhrman (2004) studied bacterial communities using ARISA (automated rRNA Intergenic spacer analysis) along an estuarine gradient. They found that some bacterioplankton taxa are specific to distinct environments while others have a ubiquitous distribution from the Brisbane River to the sea. Their study contrasts with previous results (Riemann & Middelboe 2002, Troussellier et al. 2002) by suggesting that bacterial communities are spatially heterogeneous over trophic gradients (with, however a strong salinity gradient), even within a relatively small area (~ 100 km). Indeed, few studies have shown the variability of bacterioplankton community structure over short distances, and most of them focused in upwelling areas and frontal zones or estuaries where water-masses are obviously different (Kerkhof et al. 1999, Suzuki et al. 2001, Zubkov et al. 2002, Pinhassi et al. 2003).

Different factors may have an effect on bacterial community structure (*e.g.* salinity, temperature, phytoplankton abundance and composition and organic matter availability). Temperature (Sieburth 1967) and salinity (Gonzalez & Moran 1997, Bouvier & Del Giorgio 2002) are known to be important regulating factors of bacterial community. In our study, temperature and salinity are relatively stable along the transects. We observed significant decreases of bacterial production along coast – lagoon transects (Table VI.2). This demonstrates important variations in resources available to bacterioplankton along these transects, confirmed by significantly decreasing turbidity along coast-lagoon transects. Furthermore, the bays around Nouméa City display Chlorophyll *a* concentrations that decrease along coast – lagoon transects (Table VI.2) and these gradients are accompanied by significant changes of phytoplankton populations (Jacquet et al. *in revision).* Interactions between algae and bacteria are commonly observed in both freshwater and marine ecosystems with bacteria increasingly cited as potentially important regulators in processes of algal bloom initiation, maintenance and decline (Doucette 1995a). For example, symbioses between bacteria and dinoflagellates have been well described *in vitro* and *in vivo* (Doucette et al. 1995b, Gallacher & Smith 1999, Hold et al 2001). In agreement with this, Acinas et al. (1997) interpreted spatial bacterioplankton community composition in view of phytoplankton community changes and showed the presence of bacterial communities specifically associated to certain phytoplankton groups. Therefore, resource availability and/or phytoplankton community composition may have an influence on bacterial community composition.

Our results show that we can observe small, but significant, differences in bacterioplankton community composition along most of the coast-lagoon transects sampled within the bays. These differences are associated with moderate changes in trophic conditions and virtually no change

of physical conditions (i.e. salinity and temperature). The dissimilarity is often less than 50% between stations belonging to the same transect, which means that more than 50% of the community persists in different trophic environments. Stations which are highly dissimilar are N04 and N12 for particle-attached bacteria and N04 for free-living bacteria. One important point is that particle-attached bacteria from N04 and N12 are characterized by the absence of the most frequently encountered T-RFs, and by the presence of T-RFs specific to these stations. Interestingly, these T-RFs are not encountered at station D01, a station with similar trophic characteristics (Table 2). Sainte-Marie Bay receives non-treated waste water from a large part of the city of Nouméa and this may provide an explanation for these differences.

Due to the lack of strong contrast between stations, global statistical analysis failed to show distinct community patterns associated to environmental variables determined in this study.

This overall spatial stability of bacterial communities was also observed by Riemann & Middelboe (2002) in Danish coastal waters despite several-fold differences in bacterial production and Chl.*a*. Similar to our study, the dominant bacterial phylotypes persisted across spatial gradients and they interpreted this as evidence of a wide phenotypic plasticity in bacterial physiology which would enable a few bacterial phylotypes/species to have a widespread distribution. In the Arabian Sea, Riemann et al. (1999) observed few differences in community composition of heterotrophic bacterioplankton. They observed the same 15 dominant phylotypes despite being collected from stations up to 1500 km apart with different productivity, Chl.*a* and bacterioplankton abundances. This again suggests that individual bacterial populations can adapt to and proliferate in a changing environment.

Ecological theory suggests that eutrophic systems should be less diversified (Frontier 1985). We tested this hypothesis in our samples and were unable to find any statistical relationships between the Shannon Diversity Index (either for attached or free-living bacteria) and Chl.*a* or bacterial production. The limited eutrophication conditions in the New Caledonian lagoon may not have been sufficiently different to observe such a relationship. However, Schauer et al. (2000) also failed to find a relationship between bacterioplankton Shannon Diversity Index and the trophic status along the Catalan Coast (NW Mediterranean) for a wider range of Chl.*a* values (0.13-6.28 μgl^{-1}). Predation on bacterioplankton assemblages by protists (Schäfer et al. 2001) or viruses (Weinbauer 2004) are also likely to have an influence on bacterial diversity and community structure. Bacterial diversity probably results from complex interactions between all of these potentially influencing factors and this may prevent the observation of consistent changes resulting from the limited eutrophication conditions.

VI.5.3. TEMPORAL DYNAMICS

Few studies have examined the temporal changes of bacterioplankton by means of fingerprinting techniques of 16S rDNA (Rehnstam et al. 1993, Acinas et al. 1997, Riemann et al. 1999, Riemann & Middelboe 2002, Schauer et al. 2003, Stepanauskas et al. 2003) and, to our knowledge, no such study has been carried out in a tropical area. Of these studies, almost all have shown temporal variations of bacterial community structure in parallel to changes of environmental characteristics (Murray et al. 1996, Höfle et al. 1999, Pinhassi & Hagström 2000, Stepanauskas et al. 2003) with the exception of Riemann & Middelboe (2002) who observed a relatively stable bacterioplankton community composition during a 2 month spring bloom period in Roskilde Fjord.

During the one-year survey at station M33, we observed very little change in the overall free-living community structure of the bacterioplankton. Only three population structures were observed. One was observed only once, another one dominated almost throughout the year and the third was characterized by only 3 samples. Indeed, the Bray-Curtis similarity index between successive samplings indicated a remarkable stability of free bacterioplankton community composition (Figure VI.9A). Indeed, during a 4-month period (August to December) the Bray-Curtis similarity index averaged 0.83 ± 0.01 between successive samplings, which, according to our analysis of variability among replicates, can be considered as similar.

Conversely, the community composition of particle-attached bacteria belonged to 9 structures, with one being dominant (9 out of 25 samples). Thus, variability of the community composition of particle-attached bacteria seems to be more important than that of free-living assemblages. Moreover, the Bray-Curtis similarity index shows important variations of particle-attached community composition between successive samplings (Figure VI.9B).

Temporal variations of bacterioplankton community composition are clearly different between particle-attached and free-living bacterioplankton and this further highlights the necessity of considering these two communities separately.

Particles in the SW lagoon are strongly subjected to short term influences by tides and winds (Douillet et al. 2001). Variations of inputs, deposition and resuspension rates could alter particle-attached community composition. In addition, Long & Azam (2001) have demonstrated that an important part of bacterial species expressed antagonistic activities, and that these inhibitory interactions were more frequent on particles than in free water. Thus competition for specialized niches could lead to important short term variations in the composition of the particle-attached community.

In addition, variations of the Shannon index in both free living and particle-attached bacterioplankton indicate variability in minority T-RFs. While the majority of detectable bacterial phylotypes persisted across the 1-year survey at station M33, the minority members showed rapid temporal changes. Such short term changes have already been observed in a eutrophic German lake (Jaspers et al. 2001). If we exclude potential methodological artifacts, and since the environmental parameters varied little throughout the sampling year, this variability could be due to organic matter bioavailability. However, these variations were not coincident with variations in bacterial production. This lack of correlation could be due to the fact that bacterial production is essentially due to majority groups, but at present time this cannot be tested.

VI.5.4. DIVERSITY AND THE USE OF T-RFLP TO FINGERPRINT BACTERIAL ASSEMBLAGES

This study is based on the use of T-RFLP which is an automated and sensitive method to fingerprint marine bacterial assemblages that has been shown to be effective at discriminating between microbial communities in a wide range of environments (Avaniss-Aghajani et al. 1994). DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), an alternative fingerprinting technique is often compared to T-RFLP. T-RFLP was chosen in this study, because it was shown that T-RFLP allows the detection of a larger number of T-RFs than DGGE in marine bacterioplankton communities (Moeseneder et al. 1999). Indeed, the T-RFLP method uses a laser detection system that can detect bands and peaks containing < 0.1 % of the total loaded DNA (Hewson & Fuhrman 2004).

Despite the high resolution of T-RFLP, it is possible that two different species could have the same restriction site in the 16S rDNA, resulting in identical peaks. The aim of this study was to perform a screening of spatial and temporal dynamics of bacterial community composition. Therefore, we only used one restriction enzyme (Hae III), which gives good phylogenetic precision (Dunbar et al. 2001), as opposed to the use of three enzymes for situations where a higher degree of species discrimination is required (Moeseneder et al. 1999).

Another potential bias in PCR is the possible amplification of templates such as plastids from phytoplankton. Although we cannot exclude that some peaks might be of phytoplankton origin, we consider this bias as negligible since the abundance of phytoplankton was low in this study (Chl.*a* = 0.11-1.36 $\mu g.l^{-1}$, Table VI.2)

We found a low number of T-RFs per profile in comparison with other studies using T-RFLP or ARISA but, as expected, more than those using DGGE (Table VI.7). The popularity of the T-RFLP method is increasing. However, few studies use exactly the same protocol and some parameters, like the type and number of restriction enzymes, are known to influence the number of T-RFs. In addition, analysis of the data generated is still in a developmental stage, with several technical and theoretical issues yet to be addressed. Most of the authors using T-RFLP do not proceed to standardization of the DNA quantities before comparison. In our case, omitting The standardization step would increase the total number of T-RFs from 49 to 83 in the SW lagoon of New Caledonia (Table VI.7). Dunbar et al. (2001) demonstrated how this procedure reduces artifacts arising from variations in DNA quantity between replicate profiles. It significantly reduces variation both in the number of T-RFs observed and in the height of individual peaks among replicate profiles. Standardization of the DNA quantities reduced, for example, their total number of distinct T-RFs from 169 to 132 in soil samples without changing the number of T-RFs that were consistently detected. Using whole genome DNA hybridization on community DNA, Pinhassi & Hagström (2000) found that the bacterial community from the coastal Baltic Sea was characterized by only 10 species that accounted for 50 to 80 % of the whole community. This is in agreement with the perception of low or moderate bacterial diversity in aquatic environments (See references in Pinhassi & Hagström 2000). The 6 dominant T-RFs found in our study are in agreement with this conclusion.

Table VI.7 - Number of TRFs found for total, free-living or particle-attached bacteria using fingerprinting techniques.

Source	Technique	Restriction Enzyme	Ecosystem	Number of TRFs
Hewson & Fuhrman (2004)	ARISA		Moreton Bay, Australia	Bay stations: 84 – 85 (total) Coral Sea: 39 – 59 (total)
Moeseneder et al. (1999)	T-RFLP No standardization	*CfoI* *MvnI*	North Aegean Sea North Aegean Sea	41-58 38-47
Moeseneder et al. (2001)	T-RFLP No standardization	*HhaI and RsaI*	Eastern Mediterranean Sea	Surface: 82 - 95 (free-living) Surface: 90 – 104 (attached)
Murray et al. (1996)	DGGE		San Francisco Bay	22-31 (total)
Schauer et al. (2000)	DGGE		NW Mediterranean Sea	17-35 (total)
Hollibaugh et al. (2002)	DGGE		Tuamotu atoll lagoons	25-41 (Total)
Troussellier et al. (2002)	DGGE		Rhone River Plume	34-35 (total)
This study	T-RFLP	*Hae III*	SW lagoon of New Caledonia	**with standardization** 39 (total spatial), 36 (total temporal) 49 (temporal + spatial) **without standardization** 74 (total spatial), 60 (total temporal) 83 (temporal + spatial)

VI.6. CONCLUSIONS

This study constitutes the first attempt at describing free and particle-attached bacterial diversity in the South West lagoon of New Caledonia. We have shown that free-living and particle-attached bacterial community compositions are significantly different in the south west lagoon of New Caledonia and, therefore should be considered separately in further studies.

Except at stations at the head of the bays, bacterioplankton community structure did not show important spatial variations, although significant variations can be observed along most of the eutrophication transects sampled.

Temporal dynamics of free-living and particle-attached bacterial community compositions highlight the differences between these two communities. Free-living bacterial community composition appeared remarkably stable over a 1-year survey at a station representative of average lagoonal conditions (*i.e.* away from anthropogenic influence), although resource availability varied seasonally as assessed by variations of bacterial production. Conversely, particle-attached bacterial community composition appeared to vary widely on short time scales (weeks). This variations are probably be due, in part, to the short term dynamics of particles in this ecosystem, the attached bacterial dynamics within the particles such possible antagonistic relationships or, to ecological succession on newly produced or colonized particles.

Future studies should now focus more precisely on the identity and the role of the majority T-RFs in the biogeochemical cycles in the SW lagoon of New Caledonia as well as the origin of short term dynamics of particle-attached bacterioplankton.

Acknowledgements: This work was supported by the Institut Français de Recherche pour le Développement (IRD), grants from the Programme National Environnement Côtier (PNEC) and a grant from the Ministère de l'Outre-Mer. We express our gratitude to J. Bargibant, S. Tereua and A. Lapetite and the crew of the IRD RV 'Alis' for their efficient help during sample collection and to E. Rochelle-Newall for linguistic corrections.

CHAPITRE VII

Conclusions et perspectives

CHAPITRE VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était d'étudier les **réponses des communautés phytoplanctoniques et bactériennes aux apports en nutriments dans un système côtier lagonaire tropical**. Les effets des apports eutrophisants sur le réseau trophique planctonique peuvent être étudiés selon deux approches. L'approche comparative consiste à évaluer l'abondance, l'activité, voire la composition des communautés dans divers environnements lagonaires présentant des conditions d'enrichissement contrastées et de mettre en relation ces variables avec les concentrations en nutriments. Une autre approche, de type expérimental, consiste à comparer les réponses des mêmes variables biologiques à des additions en éléments nutritifs en conditions contrôlées.

La première approche présente l'inconvénient de ne pas toujours mettre en évidence des relations causales entre variables supposées forçantes et processus étudiés. A l'opposé, si les approches expérimentales permettent d'établir plus sûrement quel nutriment ou groupe de nutriment induit une réponse d'un ou plusieurs compartiments planctoniques, le confinement lui-même est facilement à l'origine de biais dans les réponses observées. Cette deuxième approche exige par ailleurs une assez bonne connaissance préalable du système étudié afin de sélectionner de manière pertinente les sites et les périodes auxquelles ces expérimentations doivent être effectuées pour avoir une portée générale satisfaisante.

Avant ce travail de thèse, pratiquement aucune étude du fonctionnement des communautés planctoniques n'avait été réalisée sur le lagon SW de Nouvelle-Calédonie, l'approche *in situ* a donc été choisie. Cette approche se basant entièrement sur des données de terrain est rare dans les milieux oligotrophes tropicaux, souvent difficilement accessibles sur le long terme. Des approches plus expérimentales pourraient permettre par la suite d'approfondir les résultats obtenus au terme de cette première étude.

Afin d'évaluer les conséquences des apports eutrophisants sur le fonctionnement trophique microbien, nous avons tout d'abord utilisé comme variable réponse les biomasses et activités phytoplanctonique et bactérienne. Comme cela a déjà été évoqué, très peu de connaissances étaient disponibles sur les communautés planctoniques du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Il était donc nécessaire d'établir, en premier lieu, l'amplitude des variations des

productions et biomasses planctoniques, et des variables associées comme les nutriments à différentes échelles de temps (Chapitre III). En conditions météorologiques stables, des cycles nycthéméraux de concentrations en nutriments, de biomasse phytoplanctonique et d'activité bactérienne peuvent être mis en évidence. Toutefois, l'amplitude de ces variations est faible et l'extrapolation d'une mesure ponctuelle à une valeur journalière peut se faire avec une approximation raisonnable. Un suivi annuel en deux stations, de degrés trophiques contrastés, a permis de mettre en évidence des périodes de maxima (Janvier, Avril-Mai) et de minima (Août) de ces variables. Contrairement aux milieux marins tempérés, où les variables planctoniques montrent des variations saisonnières importantes, cette étude confirme une particularité des milieux tropicaux : les fluctuations à relativement court terme (1 à 2 semaines) des abondances et productions planctoniques peuvent être aussi importantes que les variations saisonnières. En accord avec les premiers exercices de modélisation (Bujan et al. 2000, Pinazo et al. 2004), ce travail suggère que le vent, principal moteur de renouvellement des eaux lagonaires par les eaux océaniques (Douillet et al. 2001), est un facteur environnemental important dans l'explication de ces variations rapides. Cette étude n'a pu, à l'aide des outils statistiques courants, évaluer l'importance de chaque facteur physique et nutritif dans l'explication des variations biologiques à l'échelle saisonnière. Pour cela, la réalisation en cours d'un modèle biogéochimique couplé à un modèle hydrodynamique permettra une meilleure compréhension des interactions entre les variables biologiques et physiques au niveau temporel. Cet exercice de modélisation fait déjà largement appel aux données acquises dans le cadre de ce travail de thèse.

Néanmoins cette étude montre que l'azote minéral dissous semble être le premier élément limitant la croissance phytoplanctonique quelle que soit la période de l'année. La ville de Nouméa et sa périphérie sont en pleine expansion, et les rejets dans le milieu lagonaire sont donc croissants. Le développement urbain côtier doit tenir compte de la sensibilité du milieu aux rejets nutritifs et donc, ainsi que le suggère cette étude, limiter en premier lieu les rejets nutritifs azotés.

La représentativité temporelle des différentes variables biologiques ayant été établie, le second objectif de cette étude était d'établir la réponse des premiers échelons du réseau trophique planctonique aux variations locales en éléments nutritifs. Les effets des apports eutrophisants ont ainsi été évalués lors d'un suivi spatial sur 30 stations, choisies dans le but de couvrir une gamme de variation la plus large possible de conditions d'enrichissement (Chapitre IV). L'échantillonnage spatial s'est déroulé à trois périodes de l'année correspondant aux maxima et minima observés lors du suivi annuel. Alors que les gradients nutritifs et biologiques persistent aux 3 périodes étudiées, les relations *in situ* entre variables biologiques et nutriments

montrent une augmentation significative de la biomasse chlorophyllienne et des productions planctoniques aux trois périodes d'échantillonnage. Ainsi, par rapport aux conditions des eaux du chenal lagonaire, bien renouvelées par les eaux océaniques, les productions primaire et bactérienne augmentent environ d'un facteur 3 dans les baies considérées comme peu altérées par les activités humaines. Dans les baies les plus affectées, les productions primaire et bactérienne augmentent environ d'un facteur 6. Cette approche a par ailleurs permis de mettre en évidence une augmentation de la production bactérienne proportionnellement plus importante que celle de la production primaire en réponse aux enrichissements. Aux stations les plus eutrophes, la demande bactérienne en carbone peut ainsi largement excéder (4,4 fois) la production primaire, ce qui suggère, soit une production dissoute considérable (et probablement peu réaliste) soit l'utilisation pour une large part de sources allochtones de matière organique. Les bactéries auraient donc un rôle d'aggravation de l'eutrophisation en utilisant les apports allochtones aux sites les plus enrichis et en permettant ainsi leur intégration dans l'ensemble du réseau trophique. Ces bilans doivent toutefois être considérés avec précaution, puisqu'ils sont basés sur de nombreuses mesures indirectes dont l'incertitude peut altérer la justesse. D'autre part, la production primaire mesurée au cours de cette étude ne prend pas en compte la production dissoute. Les premières mesures montrent qu'elle peut atteindre jusqu'à 60 % de la production primaire particulaire. L'étude des flux au sein du compartiment planctonique devra donc prendre en compte cette production dissoute à l'avenir.

L'étude quantitative de la réponse des communautés phytoplanctoniques aux enrichissements locaux montre des changements nets de structure de taille (Chapitre IV). Dans la mesure où la taille des producteurs primaires conditionne leur point d'insertion dans les réseaux trophiques planctoniques, ces modifications permettent de supposer que les conséquences trophiques des enrichissements sont plus importantes que ne le laisseraient supposer les mesures globales de production primaire. En outre, ces modifications sont accompagnées d'un changement de la structure spécifique des communautés (Chapitre V). Au sein du picophytoplancton, les *Prochlorococcus* dominent largement les effectifs dans les eaux océaniques proches et aux stations lagonaires les plus oligotrophes. Les *Synechococcus* deviennent majoritaires dans les stations de fond de baie et s'accompagnent d'un accroissement significatif de la proportion des picoeucaryotes, diminuant sensiblement le rapport cyanobactéries/picoeucaryotes.

Au sein du nano- et du microphytoplancton, les coccolithophoridés et les dinoflagellés dominent les effectifs aux sites oligotrophes, alors que les baies enrichies en nutriments

favorisent la présence de grandes diatomées, telle que la diatomée potentiellement toxique *Pseudonitzschia,* souvent observée dans les échantillons. L'augmentation de biomasse phytoplanctonique, lorsque les apports en nutriments augmentent, s'explique donc principalement par la proportion croissante des diatomées.

Les conséquences trophiques potentielles de ces changements de la composition des communautés restent à évaluer. En outre, ces modifications en réponse aux enrichissements ont très vraisemblablement des conséquences en terme d'accumulation des rejets métalliques issus des activités minières. Celles-ci sont évoquées en perspectives.

Ce travail a fourni également la première opportunité d'aborder la structure des communautés bactériennes planctoniques, ses variations temporelles et ses modifications par les enrichissements dus aux activités humaines (chapitre IV). Contrairement aux communautés phytoplanctoniques, les bactéries sont très rarement identifiables par leur morphotype et il est établi depuis longtemps que les techniques culturales sont inadaptées. Le développement depuis une quinzaine d'années des techniques moléculaires, et en particulier celles basées sur la diversité des gènes codant pour l'ARNr16S a permis d'aborder la structure des communautés planctoniques bactériennes dans de nombreux milieux.

Au cours de cette étude, cette structure et ses variations ont été étudiées au moyen de la T-RFLP basée sur le polymorphisme des fragments de restriction des gènes codant pour l'ARNr 16S qui présente l'avantage d'un taux d'acquisition relativement fort pour une résolution théoriquement élevée (2 pb). Ce travail a tout d'abord permis de montrer que dans le lagon SW de Nouvelle-Calédonie, comme dans la plupart des autres milieux étudiés, les communautés bactériennes libres et celles attachées aux particules sont sensiblement différentes. Leurs variations temporelles et spatiales en réponse aux enrichissements ont donc été distinguées.

En une station représentative des conditions lagonaires, la structure des communautés bactériennes libres reste stable au cours de l'année, alors que la disponibilité des ressources nutritives, attestée par les variations de la production de biomasse bactérienne, variait dans le même temps. A l'opposé, la variabilité des communautés bactériennes attachées aux particules semble plus importante à court terme. Ces variations étant probablement liées à la dynamique rapide des particules dans la colonne d'eau.

Le long de la plupart des gradients étudiés, les communautés bactériennes montrent des similarités d'autant plus proches que les stations dont elles étaient issues étaient voisines. Ceci montre que, malgré les biais inhérents à ces approches, ces dernières permettent de discriminer

de manière significative des changements attendus dans la structure des communautés bactériennes. Contrairement à ce qui a été observé sur la structure des communautés phytoplanctoniques, l'approche employée n'a pas montré de variations spatiales importantes des communautés bactériennes libres et attachées aux particules, excepté dans les fonds de baie (Chapitre VI). Cette relative constance des communautés bactérienne illustre, avec d'autres études (Riemann et al. 1999, Riemann & Middelboe 2002), la capacité d'adaptation et de prolifération de ces organismes aux changements survenants dans le milieu. L'abondance bactérienne varie peu le long des gradients trophiques alors que la production de biomasse bactérienne montre des différences importantes. Ceci suggère un contrôle étroit de ces communautés par la prédation. La prédation par les protistes (Schäfer et al. 2001, Simek et al 2001) ou la lyse virale (Weinbauer & Rassoulzadegan 2004, Schwalbach et al 2004) peuvent avoir une influence déterminante sur la structure des communautés bactériennes. Ce forçage des communautés par l'action des prédateurs pourrait expliquer les faibles changements observés de la côte vers le large.

Cette première approche, nécessairement descriptive, a mis en évidence des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) majoritaires tant au niveau spatial que temporel. Le lien entre structure des communautés bactériennes et leurs fonctions constitue l'un des enjeux actuels de l'écologie microbienne (Meyers 2000). L'identification de ces OTU permettrait de mieux comprendre leur rôle dans les cycles biogéochimiques des éléments.

Perspectives

Un intérêt majeur de cette étude est d'avoir considéré les compartiments bactérien et phytoplanctonique aussi bien en terme de stocks, et de flux que de communautés. Si le lien entre structure des communautés et flux n'a pu être encore abordé, la description de la structure des communautés phytoplanctoniques et bactériennes dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie constitue une première étape importante vers la compréhension de la fonction de ces organismes au sein du réseau trophique planctonique qu'il conviendra de poursuivre.

Ainsi, l'étude de la diversité bactérienne abordée dans le Chapitre VI de ce manuscrit montre une relative stabilité des communautés tant au niveau spatial que temporel. D'autres facteurs que la disponibilité des ressources nutritives peuvent influer sur la structure des communautés bactériennes (salinité, température, prédation…). Dans le lagon Sud Ouest, la salinité et la température varient sur une gamme trop étroite pour constituer des forçages significatifs. La prédation par les protozoaires a longtemps été considérée comme le facteur principal de mortalité bactérienne et celle-ci est connue pour influer dans certains cas sur la structure des assemblages bactériens (Suzuki 1999). Depuis une vingtaine d'années les données s'accumulent concernant l'existence d'importantes abondances virales ainsi que de fortes activités lytiques en milieu naturel (Bratbak et al. 1990, Paul et al. 1991) et l'abondance en bactériophages dans le milieu marin est positivement corrélée avec l'état trophique du milieu (Paul et al. 1993, Guixa-Boixereu et al. 1999). Dans la mesure où les interactions virus-hôtes sont très spécifiques, le rôle des virus sur la structuration des assemblages bactériens est vraisemblablement important. Des études récentes mettent en évidence le rôle des virus sur la structure et la diversité des communautés (Weinbauer & Rassoulzadegan 2004, Schwalbach et al 2004). Une des questions qui mériterait d'être abordée dans le prolongement de ce travail est : quel est le rôle des virus sur la structure des assemblages bactériens et sa stabilité dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie ?

La relative stabilité de la communauté s'explique notamment par la présence d'organismes bactériens dominants quelles que soient les conditions trophiques. Identifier ces organismes et déterminer le rôle qu'ils exercent dans les cycles biogéochimiques et au sein du réseau trophique planctonique constituerait ainsi une poursuite pertinente de ce travail. Pour cela, le polymorphisme des gènes ADNr16S a commencé à être étudié au cours de la thèse, selon la méthode connue sous le nom de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Kiko et al.

1979). Cette méthode consiste tout d'abord à réaliser une banque de gènes ADNr16S sur les échantillons étudiés. Les fragments amplifiés d'ADNr16S avec des amorces eubactériennes non marquées sont clonés grâce au plasmide pCR2.1-TOPO puis transformés dans la souche hôte *Escherichia coli* TOP10. L'insert est amplifié à nouveau à l'aide d'amorces flanquantes situées sur le plasmide, puis digéré par des enzymes de restriction. La comparaison des profils de restriction a permis de sélectionner les clones dominants dont les inserts ADNr16S doivent être séquencés. Les séquençages n'ont pu encore être effectués mais permettront ainsi d'identifier les organismes dominant les communautés bactériennes du lagon sud-ouest. Une partie des séquences déterminées lors de cette étude sera ensuite déposée dans une banque de données (Genbank).

L'activité bactérienne est considérée dans cette étude comme une variable indicatrice de l'état trophique du milieu. L'activité bactérienne et la méthode moléculaire utilisée dans ces études prennent en compte l'ensemble de la communauté. Le lien activité-communauté, et donc l'interprétation écologique restent limités car seule une partie de la communauté joue un rôle actif dans la production globale du compartiment bactérien hétérotrophe. Quelques techniques récemment développées permettent d'indiquer quelles espèces sont viables ou/et actives au moment de l'échantillonnage. Ainsi la LH-PCR (Urbach et al. 1999) semble la mieux adaptée à l'étude de la dynamique des espèces *in situ* en relation avec les variations des différents paramètres environnementaux. Ainsi, après avoir identifié les bactéries majoritaires mises en évidence par la T-RFLP, l'application de cette technique permettrait de connaître leur importance en terme d'activité au sein de la communauté.

Une autre perspective d'étude est liée à la méthodologie couramment employée pour mesurer les flux traversant le réseau trophique planctonique. Nous avons vu dans le Chapitre III, que le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie est soumis à des rayonnements solaires importants tout au long de l'année. Le lagon est caractérisé par des eaux généralement oligotrophes, une profondeur moyenne faible (~20 m) et une position géographique sub-tropicale, ce qui suggère que la pénétration des UV y est très importante. Au cours de ce travail, comme dans la plupart des études, les productions primaire et bactérienne ont été estimées hors influence des UV.

Or, les radiations UV peuvent avoir un impact significatif sur les activités planctoniques. Elles affectent de manière défavorable la fixation de carbone dans les océans. Des études ont mis en évidence une nette diminution de la production primaire (particulaire) sous l'effet des radiations UV en Antarctique (Moran & Zepp 2000 et références citées). De plus, les UV

peuvent augmenter la production primaire dissoute (Pausz & Herndl 1999). La production bactérienne peut également être affectée par les UV, et les effets à court terme sur les processus hétérotrophes peuvent être plus importants que sur la production primaire (Herndl et al. 1993, Aas et al. 1996, Sommaruga et al. 1997). En outre, certains travaux montrent que les radiations UV peuvent augmenter la labilité de la matière organique dissoute originellement réfractaire pour le bactérioplancton (Moran & Zepp 1997, Bushaw-Newton & Moran 1999).

Etant donné la spécificité du matériel nécessaire à ce type d'étude, nous n'avons pu évaluer l'effet des radiations UV sur la variabilité des productions bactérienne et primaire. Evaluer l'impact des radiations UV sur les activités bactérienne et phytoplanctonique, ainsi que sur la biodisponibilité de la matière organique dissoute est de toute évidence une thématique pertinente sur le lagon de Nouvelle-Calédonie. Celle-ci est actuellement abordée dans le cadre d'activités de recherche financées par le programme ECODYN (resp. X Mari).

Enfin ce travail s'est focalisé sur la structure et le fonctionnement des premiers échelons des réseaux trophiques planctoniques et leurs modifications par les apports nutritifs issus des activités humaines. Ces apports ne constituent qu'un des effets des activités anthropiques. Les apports en métaux constituent également une menace importante pour cet écosystème lagonaire. Aux apports naturels induits par le lessivage des sols ultrabasiques riches en métaux s'ajoute une contamination liée à l'exploitation minière et aux activités anthropiques (Labrosse et al. 2000). Ainsi dans les zones soumises à des apports métalliques importants (Grande Rade, baies de Dumbéa), les métaux dissous dans la colonne d'eau peuvent atteindre des concentrations considérables, 1000 fois supérieures à celles observées dans les eaux océaniques ou dans les zones lagonaires non affectées par ces apports (B. Moreton, données non publiées). La surveillance de la contamination métallique de l'environnement marin peut être évaluée à l'aide de bioindicateurs. Dans le lagon sud-ouest, 3 espèces de bivalves ont été identifiées comme pouvant être des bioindicateurs pertinents des contamination métalliques marines (Breau 2003). Pour la majorité des métaux testés, c'est le phytoplancton, nourriture de ces organismes, qui constitue la source de contamination métallique majeure (85 à 100% de la bioaccumulation totale, Hédouin et al. en prep).

Ce travail sur la structure des communautés phytoplanctonique lagonaires et ses modifications par les apports nutritifs (Chapitre VI) constitue ainsi un préalable important avant d'aborder le cheminement des métaux dans les organismes marins. Ainsi, un prolongement de ce travail sera de comprendre le rôle du phytoplancton dans le transfert des composés métalliques

vers ces candidats bioindicateurs. Pour cela, il sera tout d'abord nécessaire d'évaluer l'influence éventuelle des métaux qui pourraient, outre les apports en nutriments, contribuer à structurer les communautés phytoplanctoniques. Il s'agira ensuite d'évaluer la bioaccumulation des métaux par les espèces phytoplanctoniques les plus représentatives des milieux où s'exercent les rejets. Les apports métalliques actuels sont principalement dans les baies urbaines où les apports en nutriments conduisent à des peuplements largement dominés par les diatomées. Le développement des activités minières dans le Sud de la Nouvelle-Calédonie conduira à des apports situés dans des zones où actuellement le picophytoplancton prédomine. Il est vraisemblable que ces organismes présentent des capacités de bioaccumulation différentes. Enfin, il conviendra d'évaluer l'efficacité de transfert des métaux accumulés par le phytoplancton vers les organismes bioindicateurs. Comme pour le transfert de carbone, cette efficacité dépendra probablement des communautés impliquées et de leur point d'insertion dans le réseau trophique planctonique. Cette thématique de recherche fait l'objet d'une étude en cours de démarrage financée par le programme PNETOX (resp. E Rochelle-Newall).

La prise de conscience de la complexité des interactions existant au sein du réseau trophique microbien pélagique s'est faite en parallèle du développement des moyens techniques d'analyse. La compréhension de ces interactions est d'autant plus importante que les organismes considérés se trouvent à la base de la chaîne alimentaire. Les perturbations survenant au niveau microscopique auront alors des répercussions vers les échelons trophiques supérieurs, parfois même jusqu'à l'homme. Définir le fonctionnement type d'un réseau trophique microbien reste d'autant plus difficile qu'il évolue suivant les conditions du milieu. Il est donc essentiel de l'étudier dans des environnements aussi variés que des estuaires, des zones océaniques ou des systèmes côtiers oligotrophes. La sensibilité des microorganismes à l'état du milieu en fait de bons indicateurs des variations qui surviennent au sein des écosystèmes dans lesquels ils évoluent. Les écosystèmes côtiers subissent de nombreuses perturbations d'origine humaine, parmi lesquelles les apports en nutriments et en métaux constituent les menaces les plus importantes en Nouvelle-Calédonie. Ce travail, en apportant des connaissances sur le fonctionnement du réseau trophique microbien dans un environnement côtier oligotrophe tropical non perturbé, et en montrant l'effet des apports nutritifs sur ce fonctionnement, fournit ainsi un cadre de référence pour les études nécessaires à la maîtrise des effets de l'urbanisation et à la prise en compte des effets sur l'environnement des activités minières et industrielles.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- A -

Aas P, Lyons MM, Pledger R, Mitchell DL, Jeffrey WH (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiations in neashore waters and the Gulf of Mexico. Aquat Microb Ecol 11: 229-238

Acinas SG, Anton J, Rodriguez-Valera F (1999) Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microb 65: 514-522

Acinas SG, Rodriguez-Valera F, Pedrós-Alió C (1997) Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16s rDNA. FEMS Microbiol Ecol 24: 27-40

Agawin NSR, Duarte CM, Agusti S (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. Limnol Oceanogr 45: 591-600

Ambatsian P, Fernex F, Bernat M, Parron C, Lecolle J (1997) High metal inputs to closed seas: the New Caledonian lagoon. J Geochem Explor 59: 59-74

Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM (2002) Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. Estuaries 25: 704-726

Ault T, Velzeboer R, Zammit R (2000) Influence of nutrient availability on phytoplankton growth and community structure in the Port Adelaide River, Australia: bioassay assessment of potential nutrient limitation. Hydrobiologia 429: 89-103

Autio RM (1992) Temperature regulation of brackish water bacterioplankton. Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol 37: 253-263

Avaniss-Aghajani E, Jones K, Chapman D, Brunk C (1994) A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. Biotechniques 17: 144-149

Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar Ecol Progr Ser 105: 159-165

Azam F, Hodson RE (1977) Size distribution and activity of marine heterotrophs. Limnol Oceanogr 22: 492-501

- B -

Baltzer F (1969) Les formations végétales associées au delta de la Dumbéa (Nouvelle Calédonie). Cahier de l' ORSTOM, sér Géol 1: 59-84

Baltzer F, Trescases JJ (1971) Érosion, transport et sédimentation liés aux cyclones tropicaux dans les massifs d'ultrabasites de Nouvelle-Calédonie. Première approche du bilan général de l'altération, de l'érosion, et de la sédimentation sur péridotites en zones tropicales. Cahier de l'ORSTOM, sér Géol, 3: 221-244

Banse K (1977) Determining the carbon-to-chlorophyll ratio of natural phytoplankton. Mar Biol 41: 199-212

Bell RT (1993) Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology (Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ, eds) 495-503

Bell T, Kalff J (2001) The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. Limnol Oceanogr 46: 1243-1248

Berg GM, Balode M, Purina I, Bekere S, Béchemin C, Maestrini SY (2003) Plankton community composition in relation to availability and uptake of oxidized and reduced nitrogen. Aquat Microb Ecol 30: 263-274

Berges JA (1997) Ratios, regression statistics, and 'spurious' correlations. Limnol Oceanogr 42: 1006-1007

Bethoux JP, Morin P, Ruiz-Pino DP (2002) Temporal trends in nutrient ratios: chemical evidence of Mediterranean ecosystem changes driven by human activity. Deep-Sea Res Part II 49: 2007-2016

Bidle K, Fletcher M (1995) Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable Low-Molecular-Weight RNA analysis. Appl Environ Microbiol 61: 944-952

Binet D (1984) Copépodes planctonique du lagon de Nouvelle-Calédonie : facteurs écologiques et associations d'espèces. Mar Biol 82: 143-156

Binet D (1985) Essai d'utilisation de la diversité spécifique dans l'analyse des communautés de copépodes planctoniques du lagon de Nouvelle-Calédonie. Mar Biol 88: 85-99

Binet D, Le Borgne R (1996) The coastal station of Noumea: ten years of observations about the hydrology and pelagos of the south-west lagoon of New-Caledonia. Arch. Sci. Mer Oceanogr. Biol. Mar. Cent. Noumea ORSTOM, 37 p

Bjørnsen PK, Kuparinen J (1991) Determination of bacterioplankton biomass, net production and growth efficiency in the Southern Ocean. Mar Ecol Prog Ser 71: 185-194

Blanchot J, Rodier M (1996) Picophytoplankton abundance and biomass in the Western Tropical Pacific Ocean during the 1992 El Niño year: results from flow cytometry. Deep-Sea Res I 43: 877-895

Boesch, DF, Anderson DM, Horner RA, Shumway SE, Testor PA, Whitledge TE (1997) Harmful algae blooms in coastal waters: options for prevention, control and mitigation. NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis Series. N° 10 NOAA Coastal Ocean Office, Silver Spring, MD 46p + appendix

Bott TL (1975) Bacterial growth rates and temperature optima in a stream with a fluctuating thermal regime. Limnol Oceanogr 20: 191-197

Boucher G, Clavier J (1990) Contribution of benthic biomass to overall metabolism in New Caledonia lagoon sediments. Mar Ecol Prog Ser 64: 271-280

Boucher G, Clavier J, Garrigue C (1994) Estimation of bottom ammonium affinity in the New Caledonia lagoon. Coral Reefs 13: 13-19

Boucher G, Clavier J, Garrigue C (1994a) Oxygen and carbon dioxide fluxes at the water-sediment interface of a tropical lagoon. Mar Ecol Prog Ser 107: 185-193

Boucher G, Clavier J, Garrigue C (1994b) Estimation of ammonium affinity in the New Caledonia lagoon. Coral Reefs 13: 13-19

Bouvier T, Troussellier M, Anzil A, Courties C, Servais P (2001) Using light scatter signal to estimate bacterial biovolume by flow cytometry. Cytometry 44: 188-194

Bouvier TC, Del Giorgio PA (2002) Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. Limnol Oceanogr 47: 453-470

Boyd PW, Watson PW, Law CS, Abraham ER, Trull T, et al. (2000) A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. Nature 407:695-701

Bratbak G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. Appl Environ Microbiol 49: 1488-1493

Bratbak G, Heldal M, Norland S, Thingstad TF (1990) Viruses as partners in spring diatom bloom microbial trophodynamics. Appl Environ Microb 56: 1400-1405

Bratbak G, Thingstad TF (1985) Phytoplankton-bacteria interactions : an apparent paradox ? Analysis of a model system with both competition and commensalism. Mar Ecol Prog Ser 35: 23-30

Breau L (2003) Etude de la bioaccumulation des métaux dans quelques espèces marines tropicales : recherche de bioindicateurs de contamination et application à la surveillance de l'environnement côtier dans le lagon sud-ouest de la Nouvelle-Calédonie. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, 282 p

Breitburg D, Seitziner S, Sanders J (1999) The effects of multiple stressors on freshwater and marine environments. Limnol Oceanogr 44: 739-972

Briand E, Pringault O, Jacquet S, Torréton J-P (2004) The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterial growth efficiency. Limnol Oceanogr Methods 2: 406-416

Brittain AM, Karl DM (1990) Catabolism of tritiated thymidine by aquatic microbial communities and incorporation of tritium into RNA and protein. Appl Environ Microbiol 56: 1245-1254

Brush MJ, Brawley JW, Nixon SW, N. KJ (2002) Modeling phytoplankton production: problems with the Eppley curve and an empirical alternative. Mar Ecol Prog Ser 238: 31-45

Brzezinski MA (1985) The Si:C:N ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. J Phycol 21: 347-357

Buck KR, Chavez FP, Campbell L (1996) Basin-wide distributions of living carbon components and the inverted trophic pyramid of the central gyre of the North Atlantic Ocean, summer 1993. Aquat Microb Ecol 10: 283-298

Bujan S (2000) Modélisation biogéochimique du cycle du carbone et de l'azote dans les écosystèmes tropicaux sous influences terrigène et anthropique - Application au lagon de Nouméa (Nouvelle-Calédonie). Thèse de doctorat de l'Université de la Méditerranée - Aix Marseille II, 293 p

Bujan S, Grenz C, Fichez R, Douillet P (2000) Biogeochemical recycling in the south-west lagoon of New Caledonia. A box model approach. CR Acad Sci, Paris 323: 225-233

Bushaw-Newton KL, Moran MA (1999) Photochemical formation of biologically available nitrogen from dissolved humic substances in coastal marine systems. Aquat Microb Ecol 18: 285-292Baltzer F (1969) Les formations végétales associées au delta de la Dumbéa (Nouvelle Calédonie). Cahier de l' ORSTOM, sér Géol, 1: 59-84

- C -

Campbell L, Carpenter EJ (1986) Estimating the grazing pressure of heterotrophic nanoplankton on Synechococcus spp. Using the seawater dilution and selective inhibitor techniques. Mar Ecol Prog Ser 33: 121-129

Campbell L, Nolla HA, Vaulot D (1994) The importance of Prochlorococcus to community structure in the Central North Pacific Ocean. Limnol Oceanogr 39: 954-961

Cardinal M (1983) Etude des populations phytoplanctoniques sur la côte sud-ouest de la Nouvelle-Calédonie. 8ème colloque de la SEPANRIT La nature insulaire tropicale : spécificité et protection. 2-3 novembre 1981, Bordeaux 6-20 novembre 1981

Carlson CA, Ducklow HW (1996) Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. Aquat Microb Ecol 10: 69-85

Carlson CA, Giovannoni SJ, Hansell DA, Goldberg SJ, Parsons R, Otero MP, Vergin K, Wheeler BR (2002) Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea. Aquat Microb Ecol 30: 19-36

Caron DA (1994) Inorganic nutrients, bacteria, and the microbial loop. Microb Ecol 28: 295-298

Caron DA, Dam HG, Kremer P, Lessard EJ, Madin LP, Malone TC, Napp JM, Peele ER, Roman RM, Youngbluth MJ (1995) The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. Deep Sea Res 42: 943-972

Caron DA, Goldman JC, Andersen OK, Dennet MR (1985) Nutrient cycling in a microflagellate food chain. II. Population dynamics and carbon cycling. Mar Ecol Prog Ser 24: 243-254

Cavender-Bares KK, Mann EL, Chisholm SW, Ondrusek ME, Bidigare RR (1999) Differential response of equatorial Pacific phytoplankton to iron fertilization. Limnol Oceanogr 44: 237–246

Chardy P, Chevillon C, Clavier J (1988) Major benthic communities of the south-west lagoon of New Caledonia. Coral Reefs 7: 69-75

Chardy P, Clavier J, Gérard P, Laboute P, Martin A, Richer de Forges B (1987) Etude quantitative du benthos dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Liste taxonomique, densités et biomasses. ORSTOM, Nouméa : Rap Sci Tech, Sci Mer, Biol Mar 44 : 81p

Charpy L, Blanchot J (1998) Photosynthetic picoplankton in French Polynesian atoll lagoons: estimation of taxa contribution to biomass and production by flow cytometry. Mar Ecol Progr Ser 162: 57-70

Charpy L, Blanchot J (1999) Picophytoplankton biomass, community structure and productivity in the Great Astrolabe Lagoon, Fiji. Coral Reefs 18: 255-262

Chevillon C (1985) Contribution à l'étude sédimentaire des dépôts du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. La plaine lagonaire. DEA de l'Université Aix-Marseille, 21p

Chevillon C (1996) Skeletal composition of modern lagoon sediments in New Caledonia: coral, a minor component. Coral Reefs 15: 199-207

Chin Leo G, Kirchman DL (1988) Estimating bacterial production in marine waters from the simultaneous incorporation of thymidine and leucine. Appl Environ Microb 54: 1934-1939

Chisholm SW (1992) Phytoplankton size. In: Falkowski PG, Woodhead, AD (eds) Primary production and biogeochemical cycles in the sea New York, Plenum Press: 213-236

Christaki U, Courties C, Karayanni H, Giannakourou A, Maravelias C, Kormas K Ar, Lebaron P (2002) Dynamic characteristics of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* consumption by bacterivorous nanoflagellates. Microb Ecol 42: 341-352

Christaki U, Jacquet S, Dolan JR, Vaulot D, Rassoulzadegan F (1999) Growth and grazing on Prochlorococcus and Synechococcus by two marine ciliates. Limnol Oceanogr 44: 52-61

Clavier J, Boucher G, Garrigue C (1994) Benthic respiratory quotients in a tropical lagoon. C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie 317: 937-942

Clavier J, Chardy P, Chevillon C (1995) Sedimentation of particulate matter in the south-west lagoon of New Caledonia: spatial and temporal patterns. Est Coast Shel Sci 40: 281-294

Clavier J, Garrigue C (1999) Annual sediment primary production and respiration in a large coral reef lagoon (SW New Caledonia). Mar Ecol Progr Ser 191: 79-89

Cloern JE (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. Mar Ecol Progr Ser 210: 223-253

Coale, KH, Johnson KS, Fitzwater SE, Gordon RM, Tanner S, Chavez FP, Ferioloi L, Sakamoto C, Rogers P, Millero F, Steunberg P, Nightingale P, Cooper D, Cochlan WP, Landry MR, Constantinou J, Rolwagen G, Travasvina A, Kudela R (1996) A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. Nature 383: 495-501

Cognetti G (2001) Marine eutrophication: The need for a new indicator system. Mar Poll Bull 42: 163-164

Cohen EB, Grosslein MD, Sissinwine MP, Steirnle F, Wright WR (1982) Energy budget of Georges Bank. Can Spec Pub Fish Aquat Sci 59: 95-107

Cole JJ, Findlay S, Pace ML (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. Mar Ecol Prog Ser 73: 1-10

Collos, Y, Vaquer, A, Bibent, B, Slawyk, G, Garcia, N, Souchu, P (1997) Variability in nitrate uptake kinetics of phytoplankton communities in a Mediterranean coastal lagoon. Est Coast Shelf Res 44: 369-375

Conan P, Turley C, Stutt E, Pujo-Pay M, Van Wambeke F (1999) Relationship between phytoplankton efficiency and the proportion of bacterial production to primary production in the Mediterranean Sea. Aquat Microb Ecol 17: 131-144

Covert JS, Moran MA (2001) Molecular characterization of estuarine bacterial communities that use high- and low-molecular weight fractions of dissolved organic carbon. Aquat Microb Ecol 25: 127-139

Crump BC, Armbrust EV, Baross JA (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. Appl Environ Microbiol 65: 3192-3204

Cushing DH (1959) The seasonal variation in oceanic production as a problem in population dynamics. J Cons Int Explor Mer 24: 455-464

- D -

Dandonneau Y, Dugas F, Fourmanoir P, Magnier Y, Rougerie Y, Debenay J-P (1981) Le lagon de la Grande Terre : présentation d'ensemble, sédimentologie et hydrologie du sud-ouest. In : Atlas de la Nouvelle-Calédonie et dépendances (Anonyme,ed.). Editions ORSTOM, Paris. Planche 8

Dandonneau Y, Gohin F (1984) Meridional and seasonal variations of the sea surface chlorophyll concentration in the southwestern tropical Pacific (14 to 32°S, 160 to 175°E). Deep Sea Res 31: 1377-1393

Debenay JP (1985) Recherches sur la sédimentation actuelle et les thanatocénoses des foraminifères de grande taille dans le lagon sud-ouest et sur la marge insulaire sud de Nouvelle-Calédonie. Thèse d'Etat de l'Université d'Aix-Marseille, 200p

Del Giorgio PA, Cole JJ (1998) Bacterioplankton growth efficiency in aquatic systems. Ann Rev Ecol System 29: 503-541

Delcroix T, Lenormand O (1997) ENSO signals in the vicinity of New Caledonia, south western Pacific. Oceanol Acta 20: 481-491

Delesalle B, Pichon M, Frankignoulle M, Gattuso J-P (1993) Effects of a cyclone on coral reef phytoplankton biomass, primary production and composition (Moorea Island, French Polynesia). J Plankton Res 15: 1413-1423

Delesalle B, Sakka A, Legendre L, Pagès J, Charpy L, Loret P (2001) The phytoplankton of Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia): time and space variability of biomass, primary production and composition over 24 years. Aquat Living Res 14: 175-182

Delesalle B, Sournia A (1992) Residence time of water and phytoplankton biomass in coral reef lagoons. Cont Shelf Res 12: 939-949

DeLong EF, Franks DG, Alldredge AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. Limnol Oceanogr 38: 924-934

Desrosières R (1975) Quelques observations sur la phytoplancton océanique des abords de la Nouvelle-Calédonie (Océan Pacifique sud-ouest). Norw J Bot 22: 195-200

DiTullio GR, Hutchins DA, Bruland KW (1993) Interaction of iron and major nutrients controls phytoplankton growth and species composition in the tropical North Pacific Ocean. Limnol Oceanogr 38: 495-508

Dortch Q, Whitledge TE (1992) Does nitrogen or silicon limit phytoplankton production in the Mississippi River plums and nearby regions? Cont Shelf Res 22: 1293-1309

Doucette GJ (1995a) Assessment of the interaction of prokaryotic cells with harmful algal species. In: Toxic Marine Phytoplankton (Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien P. and Marcaillou-Le Baut, C., Eds.), pp. 385-394. Lavoisier, Paris

Doucette GJ (1995b) Interactions between harmful algae and bacteria: a review. Nat. Toxins 3: 65-74.

Douillet P (1998) Tidal dynamics of the south-west lagoon of New-Caledonia: observations and 2D numerical modelling. Oceanol. Acta. 21: 69-79

Douillet P, Ouillon P, Cordier E (2001) A numerical model for fine suspended sediment transport in the southwest lagoon of New Caledonia. Coral Reefs 20: 361-372

Drakare S (2002) Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate. Microb Ecol 44:327-335

Ducklow HW (1999) The bacterial component of the oceanic euphotic zone. FEMS Microb Ecol 30: 1-10

Ducklow H (2000) Bacterial production and biomass in the oceans. In: Microbial ecology of the oceans, Kirchman L (Ed.), Whiley-Liss, 85-120

Ducklow H, Carlson CA (1992) Oceanic bacterial production. Adv Microb Ecol 12: 113-181

Ducklow HW, Purdie DA, Williams PJ Le B, Davies JH (1986) Bacterioplankton: a sink of carbon in a coastal marine plankton community. Science 232: 865-867

Ducklow HW, Purdie DA, Williams PJ Le B, Davies JH (1987) Bacteria: link or sink? Science 235: 88-89

Dufour P, Berland B (1999) Nutrient control of phytoplanktonic biomass in atoll lagoons and Pacific Ocean waters: studies with factorial enrichment bioassays. Est Coast Shelf Sci 234: 147-166

Dufour P, Charpy L, Bonnet S, Garcia N (1999) Phytoplankton nutrient control in the oligotrophic south pacific subtropical gyre (Tuamotu Archipelago). Mar Ecol Prog Ser 179: 285-290

Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. Appl Environ Microbiol 67: 190-197

- E -

Egge JK, Aksnes DL (1992) Silicate as a regulating nutrient in phytoplankton competition. Mar Ecol Prog Ser 83: 281-289

Eilers H, Pernthaler J, Amann R (2000) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. Appl Environ Microbiol 66: 4634-4640

Estrada M, Berdalet E, Vila M, Marrasé C (2003) Effects of pulsed nutrient enrichment on enclosed phytoplankton: ecophysiological and successional responses. Aquat Microb Ecol 32: 61-71

- F -

Fagerbakke KM, Heldal M, Norland S (1996) Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. Aquat Microb Ecol 10: 15-27

Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Long RA, Azam F (2001) Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. Aquat Microb Ecol 23: 119-130

Fanning GO, Pilson MEQ (1973) On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. Anal Chem 45: 136-140

Fenchel T (1982) Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as consumers of bacteria. Mar Ecol Prog Ser 9: 35-42

Fenchel T (1988) Marine plankton food chains. Ann Rev Ecol Syst 19: 19-38

Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV (1984) Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. Appl Environ Microb 47: 49-55

Fernández E, Maranón E, Morán X, Serret P (2003) Potential causes for the unequal contribution of picophytoplankton to total biomass and productivity in oligotrophic waters. Mar Ecol Prog Ser 254: 101-109

Ferris MJ, Nold SC, Revsbech NP, Ward DM (1997) Population structure and physiological changes within a hot spring microbial mat community following disturbance. Appl Environ Microbiol 63: 1367–1374

Field K, Gordon D, Wright T, Rappé M, Urback E, Vergin K, Giovannoni S (1997) Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63: 63-70

Fisher MM, Klug JL, Lauster G, Newton M, and Triplett EW (2000) Effects of ressources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. Microb Ecol 40: 125-138

Fisher TR, Harding LW, Stanley DW, Ward LG (1988) Phytoplankton, nutrients and turbidity in the Chesapeake, Delaware and Hudson estuaries. Est Coast Shelf Sci 27: 64-93

Fleming RH (1940) The composition of plankton and units for reporting population and production. Proceedings 6th Pacific scientific congress, California 9: 535-540

Frias-Lopez J, Zerkle AL, Bonheyo GT, Fouke BW (2002) Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. Appl Environ Microbiol 68: 2214-2228

Frontier S (1985) Diversity and structure in aquatic ecosystems. Oceanogr Mar Biol Annu Rev 23: 253-312

Fuchs BM, Zubkov MV, Sahm K, Burkill PH, Amann R (2000) Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. Environ Microb 2: 191-201

Fuhrman JA (1992) Bacterioplankton roles in cycling of organic matter - The microbial food web. In: Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea (Falkowski PG & Woodhead AD, eds), Plenum Press , NewYork, 361-383

Fuhrman JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature 399: 541-548

Fuhrman JA, Azam F (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. Appl Environ Microb 39: 1085-1095

Fuhrman JA, Azam F (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. Mar Biol 66: 109-120

Fuhrman JA, Noble RT (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. Limnol Oceanogr 40: 1236–1242

Fukuda R, Ogawa H, Nagata T, Koike I (1998) Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. Appl Environ Microb 64: 3352-3358

Furnas MJ (1983) Nitrogen dynamics in lower Narragansett Bay, Rhode Island: Uptake by size-fractionated phytoplankton populations. J Plankton Res 5: 657-676

Furnas MJ (1991) Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. Limnol Oceanogr 36: 13-29

Furnas MJ, Mitchell AW (1986) Phytoplankton dynamics in the central Great Barrier Reef I Seasonal changes in biomass and community structure and their relation to intrusive activity. Cont Shelf Res 6: 636-384

Furnas MJ, Mitchell AW, Gilmartin M, Revelante N (1990) Phytoplankton biomass and primary production in semi-enclosed reef lagoons of the central Great Barrier Reef, Australia. Coral Reefs 9: 1-10

- G -

Gallacher S, Smith EA (1999) Bacteria and paralytic shellfish toxins. Protist 150: 245-255

Gamble JC, Davies JM (1982) Application of enclosures to the study of marine pelagic systems. In: Marine Mesocosms ,G.D. Grice and M.R. Reeve (eds), Springer-Verlag, New York

Garibotti IA, Vernet M, Kozlowski WA, Ferrario ME (2003) Composition and biomass of phytoplankton assemblages in coastal Antarctic waters : a comparison of chemotaxonomic and microscopic analyses. Mar Ecol Prog Ser 247: 27-42

Garrigue C (1995) Macrophyte associations on the soft bottoms of the south-west lagoon of New Caledonia: description, structure and biomass. Bot Mar 38: 481-492

Garrigue C (1998) Biomass and distribution of microphytes measured as benthic chlorophyll a in a tropical lagoon (New Caledonia, South Pacific). Hydrobiol 385: 1-10

Garrigue C, Clavier J, Bargibant G, Di Matteo A, Hamel J, Menou L, Panché J-Y, Tirard P (1992) Production primaire benthique du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Méthodes et recueil des données. Nouméa : ORSTOM. Rap Sci Tech, Sci Mer, Bio mar 63: 70 p

Garrigue C, Di Matteo A (1991) La biomasse végétale benthique du lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Résultats bruts : liste taxonomique, biomasses, pigments chlorophylliens. Nouméa : ORSTOM Arch Sci Mer, Biol mar 45: 143 p

Garrison DL, Gowing MM, Hughes MP, Campbell L, Caron DA, et al. (2000) Microbial food web structure in the Arabian Sea: a US JGOFS study. Deep-Sea Research Part II 47: 1387-1422

Gast GJ, Jonkers PJ, van Duyl FC, Bak RPM (1999) Bacteria, flagellates and nutrients in island fringing coral reef waters: Influence of the ocean, the reef and eutrophication. Bull Mar Sci 65: 523-538

Gattuso JP, Pichon M, Delesalle B, Canon C, Frankignoulle M (1996) Carbon fluxes in coral reefs. 1. Lagrangian measurements of community metabolism and resulting air-sea CO_2 disequilibrium. Mar Ecol Prog Ser 145: 109-121

Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 345: 60-63

Giovannoni SJ, Rappé M (2000) Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Microbial Ecology of the oceans (Kirchman DL, ed), 47-84

Goericke R (2002) Top-down control of phytoplankton biomass and community structure in the monsoonal Arabian Sea. Limnol Oceanogr 47: 1307-1323

Goldman JC, Caron DA, Andersen OK, Dennett MR (1985) Nutrient cycling in a microflagellate food chain: 1. Nitrogen dynamics. Mar Ecol Prog Ser 24: 231-242

González JM, Moran MA (1997) Numerical dominance of a group of marine bacteria in the a-subclass of Proteobacteria in coastal seawater. Appl Environ Microbiol 63: 4237-4242

Grant A, Ogilvie LA, Blackwood CB, Marsh T, Kim S-H, Paul EA (2003) Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis. Appl Environ Microbiol 69: 6342-6343

Grasshoff K, Eherhardt M, Kremling K (1983) Methods of seawaters analysis. Verlag Chemie, Weinheim, RFA, second edition: 419 p

Grenz C, Denis L, Boucher G, Chauvaud L, Clavier J, Fichez R, Pringault O (2003) Spatial variability in sediment oxygen consumption under winter conditions in a lagoonal system in New Caledonia (South Pacific) J Exp Mar Biol Ecol 285-286: 33-47

Guixa-Boixereu N, Vaqué D, Gasol JM, Pedros-Alio C (1999) Distribution of viruses and their potential effect on bacterioplankton in an oligotrophic marine system. Aquat Microb Ecol 19: 205-213

Gundersen K, Heldal M, Norland S, Purdie D, Knap AH (2002) Elemental C, N, and P cell content of individual bacteria collected at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. Limnol Oceanogr 47: 1525-1530

Guzman HM, Cortes J, Glynn PW, Richmond, RH (1990) Coral mortality associated with dinoflagellate blooms in the eastern Pacific (Costa Rica and Panama). Mar Ecol Prog Ser 60:299-303

- H -

Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC (1998) Effects on aquatic ecosystems. J Photochem Photobiol B 46: 53-68

Hatcher BG (1996) Organic production and decomposition. In: Life and death of coral reefs, (Birkeland C, ed), Chapman&Hall, New York, 140-174

Hédouin L, Métian M, Cotret O, Teyssié JL, Fowler SW, Fichez R, Warnau M (in prep) Delineation of heavy metal uptake pathways (seawater, food and sediment) in tropical marine bivalves using metal radiotracers

Heinänen A (1993) Measuring thymidine incorporation in the Open Baltic Sea, a temperate brackish water estuary - Comments on saturation level of thymidine. Archiv Für Hydrobiol 127: 289-298

Heldal M, Norland S, Fagerbakke KM, Thingstad F (1996) The elemental composition of bacteria: a signature of growth conditions? Mar Poll Bull 33: 3-9

Heldal M, Norland S, Tumyr O (1985) X-ray microanalytic method of measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. Appl Environ Microbiol 50: 1251-1257

Herndl GJ, Müller-Niklas G, Frick J (1993) Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. Nature 361: 717-719

Hewson I, Fuhrman JA (2004) Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. Appl Environ Microbiol 70: 3425-3433

Hietanen S, Lehtimäki J, Tuominen ML, Sivonen K, Kuparinen J (2002) *Nodularia spp*. (Cyanobacteria) incorporate leucine but not thymidine: importance for bacterial-production measurements. Aquat Microb Ecol 28: 99-104

Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollingher U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J Phycol 35: 403-424

Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of Nuclepore filters for counting bacteria in fluorescence microscopy. Appl Environ Microb 33: 1225-1228

Hoch MP, Kirchman DL (1993) Seasonal and inter-annual variability in bacterial production and biomass in a temperate estuary. Mar Ecol Prog Ser 98: 283-295

Höfle MG, Haas H, Dominik K (1999) Seasonal Dynamics of Bacterioplankton Community Structure in a Eutrophic Lake as Determined by 5S rRNA Analysis. Appl Environ Microbiol 65: 3164-3174

Hold GL, Smith EA, Rappé MS, Maas EW and 6 others (2001) Characterization of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates. FEMS Microb Ecol 37: 161-173

Hollibaugh JT, Pagès J, Torréton J-P, Wong PS (2002) Phylogenetic variation in bacterial populations from 10 atoll lagoons in the Tuamotu Archipelago, French Polynesia. In*:* Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, 14 Halifax, Canada, August 9-14, 1998. C.R. Bell, M. Brylinsky, and P. Johnson-Green, Editors. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada

Hollibaugh JT, Wong PS, Murrell MC (2000) Similarity of particle-associated and free-living bacterial communities

in northern San Francisco Bay, California. Aquat Microb Ecol 21: 103-114

Holmes MR, Aminot A, Kérouel R, Hooker BA, Peterson BJ (1999) A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Can J Fish Aquat Sci 56: 1801-1808

Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holmes RW, Strickland JDH (1965) Fluorimetric determination of chlorophyll. Cons Perm Int Explor Mer 30: 3-15

Howarth RW (1988) Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. Annu Rev Ecol Syst 19: 89-110

Howarth R, Anderson D, Cloern J, Elfring C, Hopkinson CS, Lapointe B, Malone T, Marcus N, McGlathery K, Sharpley A, Walker D (2000) Nutrient Pollution of coastal rivers, bays, and seas. Issues in Ecology n°7, 17 p

- I -

Isaksen MF, Jorgensen BB (1996) Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. Appl Environ Microbiol 62: 408-414

ISEE 2004, Institut de la Statistique et des Etudes Economiques.

- J -

Jacquet S (2001) Importance comparée des biomasses et productions bactérienne et primaire planctonique et leurs relations avec les variables physico-chimiques dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. DEA de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 32 p

Jacquet S, Delesalle B, Torréton J-P, Blanchot J (*In Revision*) Responses of the phytoplankton communities to increased anthropogenic influences (Southwestern Lagoon, New Caledonia). Mar Ecol Prog Ser *in revision*

Jacquet S, Torréton J-P, Faure V, Briand E, Pringault O (*in prep*) Temporal dynamics of planktonic communities (Soutwestern lagoon, New Caledonia)

Jaspers E, Nauhaus K, Cypionka H, Overmann J (2001) Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. FEMS Microb Ecol 36: 153-164

Jeffrey SW (1997) Application of pigment methods to oceanography. Monographs on oceanographic methodology UNESCO 127-166

Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in algae, phytoplankton and higher plants. Biochem Physiol Pflanz 167: 191-194

Justic D, Rabalais NN, Turner RE (1995) Stoichiometric nutrient balance and origin of coastal eutrophication. Mar Poll Bull 30: 41-46

Justic D, Rabalais NN, Turner RE, Dortch Q (1995) Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters, stoichiometric nutrient balance and its consequences. Est Coast Shel Sci 40: 339-356.

- K -

Kaiser E, Herndl G (1997) Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. Appl Environ Microbiol 63: 4026-4031

Kamjunke N, Jahnichen S (2000) Leucine incorporation by Microcystis aeruginosa. Limnol Oceanogr 45: 741-743

Kerkhof LJ, Voytek MA, Sherrell RM, Millie D, Schofield O (1999) Variability in bacterial community structure during upwelling in the coastal ocean. Hydrobiologia 401: 139–148

Kiko H, Niggemann E, Ruger W (1979) Physical mapping of the restriction fragments obtained from bacteriophage T4 dC-DNA with the restriction endonucleases SmaI, KpnI and BglII. Mol Gen Genet 172: 303-312

Kirchman DL (1992) Incorporation of thymidine and leucine in the subarctic Pacific: application to estimating bacterial production. Mar Ecol Prog Ser 82: 301-309

Kirchman DL (1994) The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. Microb Ecol 28: 255-271

Kirchman DL (2000) Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. In : Microbial ecology of the oceans (Kirchman L, Ed), Wiley-Liss, 261-288

Kirchman DL, Ducklow HW (1993) Estimating conversion factors for the Thymidine and Leucine methods for measuring bacterial production. In: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology (Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ, eds), 513-517

Kirchman DL, Hoch MP (1988) Bacterial production in the Delaware Bay estuary estimated from thymidine and leucine incorporation rates. Mar Ecol Prog Ser 45: 169-178

Kirchman D, K'nees E, Hodson R (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. Appl Environ Microb 49: 599-607

Kirchman DL, Rich JH (1997) Regulation of bacterial growth rates by dissolved organic carbon and temperature in the equatorial Pacific Ocean. Microb Ecol 33: 11-20

Kirk JTO (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press 509p

Kogure K, Koike I (1987) Particle counter determination of bacterial biomass in seawater. Appl Environ Microb 53: 274-277

Koroleff F (1976) Direct determination of silicon. In: methods of sea water analysis. Weinheim, RFA

Koroleff F (1983) Direct determination of silicon. In: Methods of sea water analysis (Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K, eds), 2nd ed. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Germany. 419 p

Kroer N (1994) Relationship between biovolume and carbon and nitrogen content of bacterioplankton. FEMS Microbiol Ecol 13: 217-224

- L -

Labrosse P, Fichez R, Farman R, Adams T (2000) Tropical South Pacific: New Caledonia oceanic environment, coral reefs and lagoons. Seas at the Millenium, regional chapters: the Indian Ocean to the Pacific 2: 723-736

Lacaze J-C (1996) L'eutrophisation des eaux marines et continentales – causes, manifestations, conséquences et moyens de lutte. Ellipses, 191p

Lane DJ (1991) rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stachenbradt GM, Ed), Wiley, Chichester 115-175

Lapointe BE, Barile PJ, Matzie WR (2004) Anthropogenic nutrient enrichment of seagrass and coral reef communities in the Lower Florida Keys: discrimination of local versus regional nitrogen sources. J Exp Mar Biol Ecol 308: 23-58

Latham M (1981) Aptitudes culturales et forestières. In: Sautter C (coord), Atlas de la Nouvelle Calédonie et dépendances (ORSTOM, ed), Paris (FRA), 222 p

Laws EA, Landry MR, Barber RT, Campbell L, Dickson ML, Marra J (2000) Carbon cycling in primary production bottle incubations: inferences from grazing experiments and photosynthetic studies using ^{14}C and ^{18}O in the Arabian Sea. Deep-Sea Res Part II 47: 1339-1352

Leborgne R, Rodier M, Lebouteiller A, Kulbicki M (1997) Plankton biomass and production in an open atoll lagoon - Uvea, New Caledonia. J Exp Mar Biol Ecol 212: 187-210

Lee Chen Y, Chen H, Karl DM, Takahashi M (2004) Nitrogen modulates phytoplankton growth in spring in the South China Sea. Cont Shelf Res 24: 527-541

Lee S, Fuhrman JA (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. Appl Environ Microb 53: 1298-1303

Legendre P, Legendre L (1998) Numerical Ecology, Second English Edition. Elsevier: pp 853

Legendre L, Rassoulzadegan F (1995) Plankton and nutrient dynamics in marine waters. Ophelia 41: 153-172

Lewis JB (1977) Processes of organic production on coral reefs. Biol Rev 52:305-347

Liebig J (1840) Chemistry in its application to agriculture and physiology. Taylor and Walton, London.

Liu H, Nolla AH, Campbell L (1997) Prochlorococcus growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. Aquat Microb Ecol 12: 39-47

Long RA, Azam F (2001) Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. Appl Environ Microb 67: 4975-4983

Lorenzen CJ (1966) A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. Deep-Sea Res 13: 223-227

Loya, Y, Lubinevsky H, Rosenfeld M, Kramarsky-Winter E (In press) Nutrient enrichment caused by in situ fish farms at Eilat, Red Sea is detrimental to coral reproduction. Mar Poll Bull In Press, Corrected Proof

- M -

Mackey MD, Mackey DJ, Higgins HW, Wright SW (1996) CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. Mar Ecol Prog Ser 144: 265-283

Marañón E, Cermeño P, Fernández E, Rodríguez J, Zabala L (2004) Significance and mechanisms of photosynthetic production of dissolved organic carbon in a coastal eutrophic ecosystem. Limnol Oceanogr 49: 1652–1666

Margalef R (1958) Information theory in ecology. General systems 3: 36-71

Margalef R (1978) Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. Oceanol Acta 1: 493-509

Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaulot D (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Appl Environ Microbiol 63: 186-193

Massana R, Pedrós-Alió C, Casamayor EO, Gasol JM (2001) Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. Limnol Oceanogr 46: 1181-1188

McManus GB, Fuhrman JA (1988) Control of marine bacterioplankton populations: measurement and significance of grazing. Hydrobiol 159: 51-62

McPhaden MJ (2004) Evolution of the 2002/03 El Nino. Bull Amer Meteor Soc 85: 677-695

Meyers SP (2000) Developments in aquatic microbiology. Int Microbiol 3: 203-211

Miller WL, Moran MA (1998) Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment. Limnol Oceanogr 42: 1317-1324

Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C, Herndl GJ (1999) Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 65: 3518-3525

Moeseneder MM, Winter C, Herndl GJ (2001) Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. Limnol Oceanogr 46: 95-107

Moniod F, Mlatac N (1968) Régimes hydrologiques de la Nouvelle-Calédonie. Archives de la section d'hydrologie du centre ORSTOM de Nouméa 397p

Moore LR, Post AF, Rocap G, and Chisholm SW (2002) Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. Limnol Oceanogr 47: 989-996

Moran XAG, Estrada M (2002) Phytoplanktonic DOC and POC production in the Bransfield and Gerlache Straits as derived from kinetic experiments of 14C incorporation. Deep Sea Res II 49:769-786

Moran XAG, Gasol JM, Pedrós-Alió C, Estrada M (2002) Partitioning of phytoplanktonic organic carbon production and bacterial production along a coastaloffshore gradient in the NE Atlantic during different hydrographic regimes. Aquat Microb Ecol 29:239-252

Moran MA, Zepp RG (1997) Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. Limnol Oceanogr 42: 1307-1316

Moran MA, Zepp RG (2000) UV radiation effects on microbes and microbial processes. In: Microbial Ecology of the Oceans (Kirchman DL, ed.), 201-228

Moyer CL, Dobbs FC, Karl DM (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Appl Environ Microbiol 61: 1555-1562.

Mullin JB, Riley JP (1955) The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to sea water. Anal Chim Acta 12: 162-170

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51: 63-273

Murray AE, Hollibaugh JT, Orrego C (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. Appl Environ Microbiol 62: 2676–2680.

- N -

Nagata T (2000) Production mechanisms of dissolved organic matter. In: Microbial Ecology of the Oceans (Kirchman DL, Ed). Wiley-Liss 121–152

Nagata T, Watanabe Y (1990) Carbon- and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. Appl Environ Microbiol 56: 1303-1309

Neveux J, Dupouy C,Blanchot J,Le Bouteiller A, Landry MR, Brown SL (2003) Diel dynamics of chlorophylls in high-nutrient, low-chlorophyll waters of the equatorial Pacific (180°): Interactions of growth, grazing, physiological responses, and mixing. J Geophys Res 108: 1-17

Nicet J-B, Delcroix T (2000) ENSO-related precipitation changes in New Caledonia, Southern tropical Pacific: 1969– 98. Mon Weather Rev 128: 3001-3006

Niquil N, Arias-Gonzalez JE, Delesalle B, Ulanowicz RE (1999) Characterization of the planktonic food web of Takapoto atoll lagoon, using network analysis. Oecologia 118: 232-241

Niquil N, Pouvreau S, Sakka A, Legendre L, Addessi L, Le Borgne R, Charpy L, Delesalle B (2001) Trophic web and carrying capacity in a pearl oyster farming lagoon (Takapoto, French Polynesia). Aquat Living Res 14: 165-174

Nixon SW (1995) Coastal marine eutrophication: a definition, social causes and future concerns. Ophelia 41: 199-219

Norberg J, DeAngelis D (1997) Temperature effects on stocks and stability of a phytoplankton-zooplankton model and the dependence on light and nutrients. Ecol Model 95: 75-86

Norland S, Fagerbakke KM, Heldal M (1995) Light element analysis of individual bacteria by X- ray microanalysis. Appl Environ Microbiol 61: 1357-1362

- O -

Obernosterer I, Herndl GJ (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: Dependence on the inorganic N:P ratio. Mar Ecol Prog Ser 116: 247–257

Officer CB, Ryther JH (1980) The possible importance of silicon in marine eutrophication. Mar Ecol Progr Ser 3: 83-91

Olsen Y, Reinertsen H, Vadstein O, Andersen T, Gismervik I, Duarte C, Agusti S, Stibor H, Sommer U, Lignell R, Tamminen T, Lancelot C, Rousseau V, Hoell E, Sanderud KA (2001) Comparative analysis of food webs based on flow networks: effects of nutrient supply on structure and function of coastal plankton communities. Cont Shelf Res 21: 2043-2053

Ouillon S, Douillet P, Fichez R, Panché J-Y (submitted) Enhancement of regional variations in salinity and temperature in a lagoon, New Caledonia. CR Acad Sci Paris Sciences de La Vie Submitted

- P -

Pace ML (1988) Bacterial mortality and the fate of bacterial production. Hydrobiol 159: 41-49.

Paerl HW (1997) Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as “new” nitrogen and other nutrient sources. Limnol Oceanogr 42:1154-1165

Paerl HW, Dyble J, Moisander PH, Noble RT, Piehler MF, Pinckney JL, Steppe TF, Twomey L, Valdes LM (2003) Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. FEMS Microbiol Ecol 46: 233-246

Paerl HW, Dyble J, Twomey L, Pinckney JL, Nelson J, Kerkhof L (2002) Characterizing man-made and natural modifications of microbial diversity and activity in coastal ecosystems. Ant van Leeuw 81: 487-507

Parsons TR, Albright LJ, Whitney E, Wong CS, Williams PJ le B (1981) The effect of glucose on the productivity of seawater: an experimental approach using controlled aquatic ecosystems. Mar Environ Res 4: 229-242

Partensky F, Blanchot J, Lantoine F, Neveux J, Marie D (1996) Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical NE Atlantic Ocean. Deep-Sea Res 43: 1191-1213

Partensky F, Blanchot J, Vaulot D (1999) Differential distribution and ecology of Prochlorococcus and Synechococcus in oceanic waters: a review. Bull Inst oceanogr, Monaco S19: 467-475

Paul JH, Jiang SC, Rose JB (1991) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. Appl Environ Microbiol 57: 2197-2204

Paul JH, Rose JB, Jiang SC, Kellogg CA, Dickson L (1993) Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. Appl Environ Microb 59: 718-724

Pausz C, Herndl GJ (1999) Role of ultraviolet radiation on phytoplankton extracellular release and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. Aquat Microb Ecol 18: 85-93

Pelegri SP, Dolan JR, Rassoulzadegan F (1999) Use of high temperature catalytic oxidation (HTCO) to measure carbon content of microorganisms. Aquat Microb Ecol 16: 273-280

Philippart CJM, Cadée GC, Van Raaphorst W, Riegman R (2000) Long-term phytoplankton–nutrient interactions in a shallow coastal sea: Algal community structure, nutrient budgets, and denitrification potential. Limnol Oceanogr 45: 131-144

Pinazo C, Bujan S, Douillet P, Fichez R, Grenz C, Maurin A (2004) Impact of wind and freshwater inputs on phytoplankton biomass in the coral reef lagoon of New Caledonia during the summer cyclonic period: a coupled three-dimensional biogeochemical modeling approach. Coral Reefs 23: 281-296

Pinhassi J, Berman T (2003) Differential growth response of colony-forming α- and γ-Proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. Appl Environ Microbiol 63:199–211

Pinhassi J, Hagström A (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. Aquat Microb Ecol 21: 245-256

Pinhassi J, Winding A, Binnerup SJ, Zweifel UL, Riemann B, Hagström A (2003) Spatial variability in bacterioplankton community composition at the Skagerrak-Kattegat Front. Mar Ecol Prog Ser 255: 1-13.

Pomeroy LR (1974) The ocean’s food web: A changing paradigm. Bioscience 24: 409-504

Pomeroy LR, Wiebe WJ (2001) Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. Aquat Microb Ecol 23: 187-204

Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol Oceanogr 25: 943-948

Posch T, Loferer-Krößbacher M, Gao G, Alfreider A, Pernthaler J, Psenner R (2001) Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. Aquat Microb Ecol 25: 55-63

- R -

Raimbault P, Diaz F, Pouvesle W, Boudjellal B (1999) Simultaneous determination of particulate organic carbon, nitrogen and phosphorus collected on filters, using a semi-automatic wet-oxidation method. Mar Ecol Prog Ser 180: 289-29

Raimbault P, Slawyk G, Coste B, Fry JC (1990) Feasibility of measuring an automated colorimetric procedure for the determination of seawater nitrate in the 0 to 100 nM range: examples from field and culture. Mar Biol 104: 347-351

Rappé MS, Vergin K, Giovannoni SJ (2000) Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. FEMS Microbiol Ecol 33: 219-232

Rassoulzadegan F, Laval-Peuto M, Sheldon RW (1988) Partitionning of the food ratio of marine ciliates between pico- and nanoplankton. Hydrobiol 159: 75-88

Rassoulzadegan F, Sheldon RW (1986) Predator-prey interactions of nanozooplankton and bacteria in an oligtrophic marine environment. Limnol Oceanogr 31: 1010-1021

Rath J, Wu KY, Herndl GJ, DeLong EF (1998) High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. Aquat Microb Ecol 14: 261-269

Redfield AC (1934) On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. James Johnston Memorial Volume, Liverpool, 176-192

Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA (1963) The influence of organisms on the composition of seawater. In: The Sea, Vol 2 (Hill MN, ed). John Wiley, New York 26-77

Rehnstam AS, Bäckman S, Smith DC, Azam F, Hagström A (1993) Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. FEMS Microb Ecol 102: 161-166

Revelante N, Gilmartin M (1982) Dynamics of phytoplankton in the Great Barrier Reef lagoon. J Plankton Res 4: 47-76

Revelante N, Williams WT, Bunt JS (1982) Temporal and spatial distribution of diatoms, dinoflagellates and Trichodesmium in waters of the Great Barrier Reef. J Exp Mar Biol Ecol 63: 27-45

Riedel GTF, Sanders JG (2003) The interrelationships among trace element cycling, nutrient loading, and system complexity in estuaries: a mesocosm study. Estuaries 26: 339-351

Riemann B, Bjoernsen PK, Newell S, Fallon R (1987) Calculation of cell production of coastal marine bacteria based on measured incorporation of 3H-thymidine. Limnol Oceanogr 32: 471-476

Riemann L, Middelboe M (2002) Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. Aquat Microb Ecol 27: 219-232

Riemann L, Steward GF, Fandino LB, Campbell L, Landry MR, Azam F (1999) Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes. Deep Sea Res II 46: 1791-1811

Rodriguez J, Tintoré J, Allen JT, Blanco JM, Gomis D, Reul A, Ruiz J, Rodriguez V, Echevarria F, Jimenez-Gomez F (2001) Mesoscale vertical motion and the size structure of phytoplankton in the ocean. Nature 410: 360-363

Rohwer F, Breitbart M, Jara J, Azam F, Knowlton N (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. Coral Reefs 20: 85–95

Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Mar Ecol Prog Ser 243: 1-10

Rougerie F (1985) The New Caledonian south-west lagoon: circulation, hydrological specificity and productivity. Proc. 5th Int Coral Reef Congr, Tahiti, 6: 17-22

- S -

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 350-1354

Sakka A, Legendre L, Gosselin M, LeBlanc B, Delesalle B, Price NM (1999) Nitrate, phosphate, and iron limitation of the phytoplankton assemblage in the lagoon of Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). Aquat Microb Ecol 19: 149-161

Sakka A, Legendre L, Gosselin M, Niquil N, Delesalle B (2002) Carbon budget of the planktonic food web in an atoll lagoon (Takapoto, French Polynesia). J Plankton Res 24: 301-320

Sala MM, Peters F, Gasol JM, Pedrós-Alió C, Marrasé C, Vaqué D (2002) Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. Aquat Microb Ecol 27: 47-56

Samuelsson K, Berglund J, Haecky P, Andersson A (2002) Structural changes in an aquatic microbial food web caused by inorganic nutrient addition. Aquat Microb Ecol 29: 29-38

Sañudo-Wilhelmy SA, Tovar-Sanchez A, Fu F-X, Capone DG, Carpenter EJ, Hutchins DA (2004) The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Redfield stoichiometry. Nature 432: 897-901

Scavia D (1988) On the role of bacteria in secondary production. Limnol Oceanogr 33: 1220-1224

Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, Stackebrandt E, Troussellier M, Guindulain T, Vives-Rego J, Muyzer G (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. FEMS Microbiol Ecol 34: 243-253

Schauer M, Balagué V, Pedrós-Alió C, Massana R (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. Aquat Microb Ecol 31: 163-174

Schauer M, Massana R, Pedrós-Alió C (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. FEMS Microbiol Ecol 33: 51-59

Schwalbach MS, Hewson I, Fuhrman JA (2004) Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms. Aquat Microb Ecol 34: 117-127

Servais P (1992) Bacterial production measured by ^{3}H-thymidine and ^{3}H-leucine incorporation in various aquatic ecosystems. Archiv Für Hydrobiologie 37: 73-81

Sherr EB, Sherr BF (1986) Small, aloricate ciliates as a major component of the marine heterotrophic nanoplankton. Limnol Oceanogr 31: 177-183

Sherr EB, Sherr BF (1988) Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. Limnol Oceanogr 33: 1225-1227

Sherr BF, Sherr EB, Albright LJ (1987) Bacteria: Link or sink ? Science 235: 88 (technical comment)

Sherr EB, Sherr BF, Berman T, McCarthy JJ (1982) Differences in nitrate and ammonia uptake among components of a phytoplankton population. J Plankton Res 4: 961-965

Sherr EB, Sherr BF, Tamara LA, Fallon RD, Newell SY (1986) Trophic interactions between heterotrophic protozoa and bacterioplankton in estuarine water analyzed with selective metabolic inhibitors. Mar Ecol Progr Ser 32: 169-179

Shiah FK, Ducklow HW (1994) Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. Mar Ecol Progr Ser 103: 297-308

Shiah FK, Liu KK, Gong GC (1999) Temperature versus substrate limitation of heterotrophic bacterioplankton production across trophic and temperature gradients in the East China Sea. Aquat Microb Ecol 17: 247-254

Sieburth, JM (1967) Seasonal selection of estuarine bacteria by water temperature. J Exp Mar Biol Ecol 1: 98 - 121

Simek K, Pernthaler J, Weinbauer MG, Hornak K, Dolan JR, Nedoma J, Masin M, Amann R (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. Appl Env Microb 67: 2723-2733

Simon M, Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. Mar Ecol Prog Ser 51: 201-213

Smayda TJ (1989) Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: A linkage? In: Novel Phytoplankton Blooms: Causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms coastal and estuarine studies (Cosper EM, Carpenter EJ, Bricelj VM, eds), Springer-Verlag, New-York, 449-483

Smith SV (1984) Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. Limnol Oceanogr 29: 1149-1160

Smith VH (2003) Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - a global problem. Environ Sci and Pollut Res 10: 126-139

Smith VH, Tilman GD, Nekola JC (1999) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environ poll 100: 179-196

Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin 38: 1409-1438

Sokal RR, Rohlf GJ (1995) Biometry. Freeman, New York, 887p

Sommaruga R, Obernosterer I, Herndl GJ, Psenner R (1997) Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bactérioplancton. Appl Environ Microbiol 63: 4178-4184

Staley J, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of non photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Ann Rev Microbiol 39: 321-346

Steele JH (1974) The structure of Marine Ecosystems. Harvard University of Cambridge, MA. 128 p

Steeman-Nielsen E (1951) Measurement of the production of the organic matter in the sea by mean of carbon 14. Nature 167: 684-685

Stepanauskas R, Moran MA, Bergamaschi BA, Hollibaugh JT (2003) Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. Aquat Microb Ecol 31: 85-98

Strayer D (1988) On the limits to secondary production. Limnol Oceanogr 33: 1217-1220

Suzuki MT (1999) Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. Aquat Microb Ecol 20: 261-272

Suzuki MT, Preston CM, Chavez FP, DeLong EF (2001) Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. Aquat Microb Ecol 24: 117–127

- T -

Tada K, Sakai K, Nakano Y, Takemura A, Montani S (2003) Size-fractionated phytoplankton biomass in coral reef waters off Sesoko Island, Okinawa, Japan. J Plankton Res 25: 991-997

Tenório MMB, LeBorgne R, Rodier M, Neveux J (In Revision) The impact of terrigeneous inputs on the Bay of Ouinné (New Caledonia) phytoplankton communities: a spectrofluorometric and microscopic approach. In revision for Est Coast Shelf Sci

Ter Braak CJF (1995) Ordination. In: Jongman RHG, ter Braak CJF, van Tongeren OFR (eds), Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge University Press, p 91-173

Tezuka Y (1990) Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen :phosphorus ratio of organic substrates. Microb Ecol 19: 227-238

Thingstad TF, Zweifel UL, Rassoulzadegan F (1998) P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the Northwest Mediterranean. Limnol Oceanogr 43: 88-94

Tibbles BJ, Harris JM (1996) Use of radiolabelled thymidine and leucine to estimate bacterial production in soils from continental Antarctica. Appl Environ Microbiol 62: 694-701

Tomas CR (1996) Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic Press, 598 p

Torréton JP, Bouvy M (1991) Estimating bacterial DNA synthesis from (3H)-thymidine incorporation: Discrepancies among macromolecular extraction procedures. Limnol Oceanogr 36: 299-306

Torréton JP, Dufour P (1996) Bacterioplankton production determined by DNA synthesis, protein synthesis, and frequency of dividing cells in Tuamotu atoll lagoons and surrounding ocean. Microb Ecol 32: 185-202

Torréton J-P, Pringault O, Jacquet S, Chifflet S, Moreton B, Panché J-Y, Rodier M, Gérard P, Blanchot J (2004) Rapport des missions BULA 3 (mars 2002) et BULA 4 (août 2003) dans le lagon de Suva (Fidji). Rapports de missions. Sciences de la Mer. Biologie Marine IRD, Nouméa Report n°: 27, 45p

Torréton J-P, Talbot V, Garcia N (2000) Nutrient stimulation of bacterioplankton growth in Tuamotu atoll lagoons. Aquat Microb Ecol 21: 125-137

Torréton J-P, Van Den Broeck N, Moutin T, Raimbault P, Delesalle B, Ferrier-Pagès C, Blanchot J, Faure V, Jacquet S (*In prep*) Ammonium and phosphorous uptakes by bacterioplankton and phytoplankton in New Caledonian lagoon waters of contrasted trophic status.

Trescases JJ (1975) L'évolution géochimique supergène des roches ultrabasiques en zone tropicale – formation des gisements nickélifères de Nouvelle-Calédonie. Mémoires ORSTOM 78 : 288 p

Troussellier M, Schäfer H, Batailler N, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Muyzer G, Servais P, J. V-R (2002) Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhone River plume, France). Aquat Microb Ecol 28: 13-24

Turner JT, Tester PA (1997) Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. Limnol Oceanogr 42: 1203 – 1214

Tyrrell T (1999) The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature 400: 525-531

- U -

Urbach E, Vergin KL, Giovannoni SJ (1999) Immunological detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria. Appl Env Microb 65: 1207-1213

Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommung der qualitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt Int Theor angew Limnol 9: 1-38

- V -

Van Duyl F, Gast G, Steinhoff W, Kloff S, Veldhuis M, Bak RPM (2002) Factors influencing the short-term variation in phytoplankton composition and biomass in coral reef waters. Coral Reefs 21: 293-306

Vaulot D, Courties C, Partensky F (1989) A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. Cytometry 10: 629-635

Vollenweider RA (1976) Advances in defining critical loading levels of phosphorus in lake eutrophication. Mem Ist Ital Idrobiol 33: 53-83

Vrede K, Heldal M, Norland S, Bratbak G (2002) Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. Appl Envir Microbiol 8: 2965-2971

- W -

Wang W-X (2002) Interactions of trace metals and different marine food chains. Mar Ecol Prog Ser 243: 295-309

Warnau M, Hédouin L, Métian M, Cotret O, Teyssié J-L, Fichez R, Fowler SW (2004) Bioaccumulation of heavy metals in three bivalves (Isognomon isognomon, Malleus regula and Gafrarium tumidum) and one algae (Lobophora variegata) from New Caledonia: a radiotracer investigation. Haliotis sous presse

Watson SW, Novitsky TJ, Quinby HL, Valois FW (1977) Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. Appl Environ Microb 33: 940 - 946

Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev 28: 127-181

Weinbauer MG, Höfle MG (1998) Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. Appl Environ Microb 64: 3776-3783.

Weinbauer MG, Rassoulzadegan F (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? Envir Microbiol 6: 1-11

Weisburg WG, Barn SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173: 697-703

Wheeler PA, Kirchman DL (1986) Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. Limnol Oceanogr 31: 998-1009

White PA, Kalff J, Rasmussen JB, Gasol JM (1991) The effect of Temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. Microb Ecol 21: 99-118

Wiadnyana NN, Rassoulzadegan F (1989) Selective feeding of *Acartia clausi* and *Centropages typicus* on microzooplankton. Mar Ecol Prog Ser 53: 37-45

Wicks RJ, Robarts RD (1987) The extraction and purification of DNA labelled with [methyl-3H] thymidine in aquatic bacterial production studies. J Plankton Res 9: 1167-1181

Wilhelm SW, Suttle CA (1999) Viruses and nutrient cycles in the Sea. Bioscience 49: 781-788

Williams PJ le B (1984) Bacterial production in the marine food chain: the emperor's new suit of clothes? In: Flows of energy and materials in marine ecosystems (Fasham MRJ, ed), Plenum Press, New York, 271-300

Williamson CE, Stemberger RS, Morris DP, Frost TM, Paulsen SG (1996) Ultraviolet radiation in North American lakes: Attenuation estimates from DOC measurements and implications for plankton communities. Limnol Oceanogr 41: 1024-1034

Woese CR (1987) Microbial Evolution. Microb Rev 51:221-271

Wood ED, Armstrong FA, Richards FA (1967) Determination of nitrate in seawater by cadmium copper reduction to nitrite. J Mar Biol Ass UK 47: 23-31

Wu JF, Sunda W, Boyle EA, Karl DM (2000) Phosphate depletion in the Western North Atlantic Ocean. Science 289: 759–762

- Y -

Yentsch CS, Menzel DW (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. Deep Sea Res 10: 221-231

- Z -

Zann LP (1994) The status of coral reefs in South Western Pacific Islands. Mar Poll Bull 29: 52-61

Zingone A, Oksfeldt-Enevoldsen H (2000) The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. Ocean Coast Manage 43: 725-748

Zubkov MV, Fuchs BM, Eilers H, Burkill PH, Amann R (1999) Determination of total protein content of bacterial vells by SYPRO staining and flow cytometry. Appl Environ Microbiol 65: 3251-3257

Zubkov MV, Fuchs BM, Tarran GA, Burkill BH, Amann R (2002) Mesoscale distribution of dominant bacterioplankton groups in the northern North Sea in early summer. Aquat Microb Ecol 29: 135–144

Zubkov MV, Sleigh MA, Burkill PH (2001) Heterotrophic bacterial turnover along the 20°W meridian between 59°N and 37°N in July 1996. Deep-Sea Res Part II 48: 987-1001

Zweifel UL, Norman B, Hagström A (1993) Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. Mar Ecol Prog Ser 101: 23-32

Annexes

VII.1. PUBLICATIONS

Briand E, Pringault O, **Jacquet S,** Torréton J-P (2004) The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton carbon growth efficiency along trophic gradients in a coral reef lagoon. Limnology and Oceanography: Methods, 2: 406-416.

Jacquet S, Delesalle B, Torréton J-P, Blanchot J Spatial phytoplankton composition in relation to eutrophication in the SW lagoon of New-Caledonia. En révision pour Marine Ecology Progress Series.

Jacquet S, Duran R, Torréton J-P, Troussellier M Spatial and temporal bacterial community in relation to eutrophication in the SW lagoon of New-Caledonia. Prochainement soumis dans Microbial Ecology.

Jacquet S, Torréton J-P, Faure V**,** Briand E, Pringault O Temporal dynamics of planktonic communities (Soutwestern lagoon, New Caledonia). Prochainement soumis dans Coral reefs.

VII.2. RAPPORTS

Jacquet S, Torréton J-P, Delesalle B, Duran R, Blanchot J, Pringault O, Chifflet S (2005) Rapport sur la « Diversité planctonique et ses modifications par les apports anthropiques dans le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie », à l'attention du Ministére de l'Outre Mer, au titre du thème 1 « Caractérisation et valorisation de la Biodiversité ». 52 p.

Torréton J-P, Pringault O, **Jacquet S**, Chifflet S, Moreton B, Panché JY, Rodier M, Gérard P, Blanchot J (2004) Rapport des missions Bula 3 (mars 2002) et Bula 4 (août 2003) dans le lagon de Suva. Centre IRD de Nouméa. Rapports de missions. Sciences de la Mer. Biologie Marine N°27. 45 p.

VII.3. COMMUNICATIONS

International

Jacquet S, Delesalle B, Torréton J-P, Blanchot J (2004) Spatial phytoplankton composition in relation to eutrophication in the SW lagoon of New-Caledonia. 10th International Coral Reef Symposium (ICRS), Okinawa, Japan, 28 june - 2 july 2004. Présentation orale.

Jacquet S, Duran R, Torréton J-P, Troussellier M (2004) Spatial and temporal bacterial community structure in relation to eutrophication in the SW lagoon of New-Caledonia. ASLO Summer meeting, Savannah, Georgia, USA, 13 - 18 june 2004. Présentation orale.

Dolan J R, **Jacquet S**, Torréton J-P (2004) Temporal variability of diversity among marine planktonic microorganisms (tintinnid ciliates) in temperate and tropical sites. European Geosciences Union, 1st General Assembly, Nice 25 -30 April 2004. Présentation orale.

National

Jacquet S, Blanchot J, Delesalle B, Duran R, Torréton J-P (2004). Réponses des communautés planctoniques à une influence anthropique croissante – Lagon sud ouest de Nouvelle-Calédonie – Assises de la Recherche Française dans le Pacifique, Nouvelle-Calédonie, 24-27 août 2004. 1er prix du poster étudiant.

Jacquet S, Torréton J-P, Duran R, Troussellier M (2004) Structure spatiale et temporelle des communautés bactériennes en fonction de l'eutrophisation dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Journée des Doctorants IRD Nouméa – 27 mai 2004. Présentation orale.

Fichez R, Breau L, Chevillon C, Chifflet S, Douillet P, Faure V, Hédouin L, **Jacquet S**, Ouillon S, Pringault O, Torréton J-P, Viret H, Warnau M (2003) Origine, transport et devenir des apports terrigènes et anthropiques dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie. Congrès Union des Océanographe de France, Marseille, 8-10 septembre 2003.

Torréton J-P, **Jacquet S**, Delesalle B, Blanchot J, Duran R (2003) Réponses des communautés planctoniques aux changements de conditions trophiques dans le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie. Station Marine de Villefranche, Juillet 2003, conférence invitée.

Jacquet S, Torréton J-P, Delesalle B, Blanchot J, Van-Den-Broeck N (2003) Réponses des communautés planctoniques le long de gradients d'enrichissements en milieu oligotrophe sub-tropical (lagon SW de Nouvelle-Calédonie). Colloque d'Ecologie Microbienne, 25 - 28 mai 2003, Carry-Le-Rouet, France. Présentation orale.

Torréton J-P, **Jacquet S**, Delesalle B, Blanchot J (2002) Effets des activités humaines sur le lagon de Nouméa : Interactions entre milieu et peuplements planctoniques et benthiques. Journées de prospective du Programme National Environnement Côtier, Banyuls, 16-17 décembre 2002. Présentation orale.

Torréton J-P, **Jacquet S** (2002) Réponse des biocénoses pélagiques Séminaire PNEC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 17-20 septembre 2002. Présentation orale.

LIMNOLOGY
and
OCEANOGRAPHY: METHODS

Limnol. Oceanogr.: Methods 2, 2004, 406–416
© 2004, by the American Society of Limnology and Oceanography, Inc.

The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency

Enora Briand[1,2], Olivier Pringault[1], Séverine Jacquet[1], and Jean Pascal Torréton[1]*
[1]UR 103 Camélia, Centre IRD de Nouméa BP A5, 98848 Nouméa Cedex, Nouvelle Calédonie
[2]UR 98 Flag, Centre IRD de Bel Air, BP 1386 CP 18524 Dakar, Sénégal

Abstract

Heterotrophic bacterial growth efficiency (BGE), the ratio between the carbon consumed and the bacterial biomass produced, is a key factor in understanding flows of organic matter in aquatic ecosystems. Methods generally used to estimate bacterial respiration require long incubations (24 to 36 h) to measure significant rates during which nonlinear patterns of oxygen decrease may bias BGE computation. These respiration estimates are generally compared to bacterial production rates determined from radiotracer incorporation from much shorter incubations. The aim of this study was to improve the determination of bacterial respiration to better estimate BGE. For this purpose, we employed oxygen microprobes in predator free (0.6 µm filtered) seawater samples and determined in parallel bacterial abundance. The use of oxygen microprobes allowed us to continuously monitor oxygen concentration during the incubation. Hence, the length of incubation can be adjusted as soon as a significant decrease of oxygen is observed. At the most productive sites, respiration was measurable from the beginning of the incubation and varied with time. In contrast, at the oligotrophic sites, respiration was often detectable only after a lag-phase of 5 to 10 h and remained constant thereafter. BGE was computed from the changes in bacterial abundance observed during the respiration measurements. This way, both processes were determined in similar incubation conditions. In comparison, the use of radiotracer derived bacterial production systematically resulted in an underestimation of BGE.

Heterotrophic bacteria play a predominant role in aquatic ecosystems. In terms of their numerical abundance, they are the most important biological component involved in the transformation and mineralization of organic matter in the biosphere (Cho and Azam 1988). It is well established that they process at least about one half of the total carbon flux passing through marine planktonic network (Fuhrman 1992). Heterotrophic bacteria contribute to the cycles of nutrients and carbon in two major ways: by the production of new bacterial biomass (secondary production) and by the remineralization of organic carbon and nutrients (del Giorgio and Cole 1998). Understanding this dual character of planktonic bacteria in aquatic ecosystems is a central paradigm of contemporary microbial ecology (Pomeroy et al. 1991; Ducklow and Carlson 1992). Consequently, knowledge of BGE, the ratio between carbon consumed and bacterial biomass produced, is a prerequisite for the evaluation of carbon budgets in aquatic ecosystems.

Many authors clearly emphasize the fact that BGE varies in time (Lemée et al. 2002) and space (Griffith et al. 1990). In fact, BGE depends on a variety of factors such as the quantity and quality of organic matter and minerals. More precisely, BGE appears dependent upon substrate C/N ratios (Kroer 1993; Jorgensen et al. 1994) and substrate molecular weight (Tulonen et al. 1992; Amon and Benner 1996). BGE also seems positively correlated with inorganic nutrient availability (Tulonen et al. 1992; Kroer 1993; Zweifel et al. 1993), the concentration of the labile carbon pool (Barillier and Garnier 1993; Middelboe and Sondergaard 1993) and to bacterioplankton growth rates (Middelboe et al. 1992). BGE was reported to be negatively correlated to temperature (Bjornsen 1986, Daneri et al. 1994), but other results did not support this hypothesis (Barillier and Garnier 1993; Kroer 1993). Therefore, many processes are likely to govern BGE and these processes can themselves answer different factors of control (del Giorgio and Cole 1998). The very large variability of BGE in any one system suggests that at the present time, BGE values may not be extrapolated from literature data when a new ecosystem is investigated.

*Corresponding author. Telephone: +687 26 08 12; fax: +687 26 43 26; e-mail: olivier.pringault@noumea.ird.nc

Acknowledgments

This work was supported by the "Institut Français de Recherche pour le Développement" (IRD) and a grant from the French "Programme National Environnement Côtier" (PNEC). We express our gratitude to S. Tereua and A. Lapetite for their efficient help during sample collection. Emma Rochelle-Newall is thanked for her comments and suggestions.

BGE can be determined by two different ways. First estimations have been based on use of simple sources of organic carbon by radiotracers (Hobbie and Crawford 1969). In spite of the advantage brought by this approach (high sensitivity, short times of incubation, no uncoupling), the use of simple compounds, generally labile, cannot be representative of the diversity of substrates used by bacteria (del Giorgio and Cole 1998). As a consequence, this method presents the major drawback of overestimating BGE, which can reach values of 97% depending on substrate used and the measurement conditions (Bjornsen 1986). The other methods need uncoupling (e.g., bacteria must be physically separated from other planktonic components) in an aim to specifically determine activities of heterotrophic bacteria. This is usually attempted by filtration in the 2- to 0.6-µm range. These methods consist of measuring bacterial consumption of available organic matter in situ and comparing it to an estimator of bacterial production. Bacterial production is most often determined using radiotracer incorporation (^{3}H-thymidine or leucine) but can also be estimated from changes in bacterial abundances. To measure bacterial consumption of organic matter, different indicators have been proposed: dissolved organic carbon (DOC) consumption (Middelboe et al. 1992; Kroer 1993; Zweifel et al. 1993; Carlson and Ducklow 1996), O_2 consumption (Pomeroy et al. 1994; Pomeroy et al. 1995), or CO_2 production (Bjornsen 1986). However, these methods most often require long incubation times (24, 36, or 72 h) to measure significant variations of DOC, O_2, or CO_2. Therefore, bottle effect may induce changes of bacterial community composition (Massana et al. 2001; Gattuso et al. 2002) and/or exhaust trophic resources (Pradeep Ram et al. 2003). Consequently, the results may not be representative of the initial bacterial assemblage. It is therefore important to estimate the BGE with a method that allows continuous measurement of consumption of organic matter during an incubation time less than 24 h.

Oxygen may be continuously monitored using different techniques such as respirometers with oxygen macroprobes, which have been developed in the last few years (Langdon 1993; Taylor et al. 2003). Recently, a semicontinuous technique based on mass spectrometry determination of oxygen (Kana 1994) has been employed to measure bacterial respiration in estuarine waters (Bouvier and del Giorgio 2002; del Giorgio and Bouvier 2002). In this study, we present a method using oxygen microprobes to estimate bacterial respiration with the aim to determine bacterial growth efficiency. Oxygen microprobes have been in use for more than 20 years in benthic systems, however this technique has yet to be applied to planktonic systems. We first describe the advantages of this method, which allows a continuous monitoring of the oxygen concentration. Then, we have used this procedure to estimate BGE in contrasted trophic situations in the southwest lagoon of New Caledonia.

Materials and procedures

Study sites—Water samples were collected in the southwest of the New Caledonian lagoon (2,000 km^2), mostly in the vicinity of the city of Nouméa (125,000 inhabitants) and surrounding bays (Fig. 1). The average depth of the SW lagoon is 21 m, and the main channel is 25 m deep on average, whereas bay stations are somewhat shallower (Table 1). A total of 16 stations were sampled along 3 transects with the objective to obtain a large trophic range.

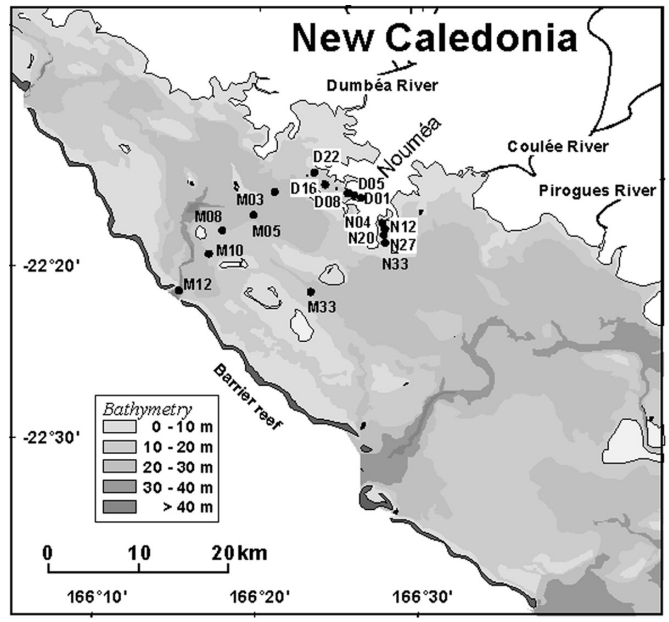


Fig. 1. SW Lagoon of New Caledonia and location of study sites.

The stations of "open lagoon" transect (M03, M05, M08, M10, M12; Fig. 1) are rapidly renewed by oceanic waters entering through the southern part (Douillet 1998). Far from the terrigeneous and anthropogenic influences, these stations are generally the most oligotrophic of this area. The "Sainte Marie" transect (N04, N12, N20, N27, N33, M33) is located in the eutrophic Sainte Marie Bay. This bay receives untreated wastewaters from the surrounding urban area. Finally, the "Grande Rade" stations (D01, D05, D08, D16, D22) are impacted by urban effluents and contaminants from the nickel industry. Both these latter sites present a decreasing degree of eutrophication between coast and opening of the bays.

The availability of oxygen-measuring equipment allowed the sampling of only one site at a time. For each sampling, water column variables (conductivity, temperature, in vivo chlorophyll fluorescence, and photosynthetically active radiations) were recorded with a Seabird SBE 19 CTD probe. Water samples were collected at 3 m depth using acid-washed 5-L Niskin bottles. Previous work has shown that this depth of sampling provides a representative sample of the whole water column (Jacquet et al. unpubl. data unref.). Samples were kept in Niskin bottles until return to the laboratory within 90 min.

Bacterial respiration—Upon return to the laboratory, 600 µL of lagoon water were immediately prescreened through a 125-µm mesh to eliminate the larger, less abundant organisms that

Table 1. Average characteristics of the stations sampled over the whole water column

Date	Station	Maximum depth (m)	Salinity (psu)	Temperature (°C)	Turbidity (ftu)	Chl (µg/L)
3 Mar 03	D01	6.5	33.291	29.13	5.83	1.37
6 Mar 03	D01	6.5	35.317	27.71	5.80	1.08
10 Mar 03	N04	11.5	35.275	28.19	1.52	0.99
12 Mar 03	M12	38.5	35.380	27.31	0.31	0.54
18 Mar 03	M03	25.2	35.134	26.50	1.12	1.33
19 Mar 03	M10	28.5	35.281	25.60	0.66	0.87
20 Mar 03	M08	15.5	35.216	26.27	0.56	0.66
21 Mar 03	M05	33.0	35.245	26.11	0.78	0.44
24 Mar 03	N04	11.5	35.036	28.22	4.03	4.47
25 Mar 03	N12	14.5	35.160	27.34	2.52	1.23
26 Mar 03	N20	12.5	35.127	27.66	0.84	1.16
27 Mar 03	N27	15.0	35.167	27.65	1.46	2.23
28 Mar 03	N33	17.6	35.233	27.27	1.12	0.71
31 Mar 03	D01	6.5	35.325	27.25	2.17	1.46
1 Apr 03	D05	12.3	35.302	27.15	1.8	0.80
2 Apr 03	D08	13.0	35.271	26.96	1.27	0.89
3 Apr 03	D16	15.8	35.301	26.72	1.11	0.61
4 Apr 03	D22	17.0	35.263	26.73	0.89	0.43
8 Apr 03	N33	17.6	35.250	26.41	1.15	1.21
10 Apr 03	N12	14.5	34.842	26.43	3.20	2.64
15 Apr 03	N12	14.5	34.948	25.72	1.23	0.81
22 Apr 03	M33	19.0	35.452	25.33	0.17	0.55
22 Apr 03	N12	14.5	35.168	25.61	1.79	0.68
6 May 03	N12	14.5	35.080	24.84	2.04	1.00

D01, N04, and N12 were sampled twice and processed independently.

were likely to increase the variability of the oxygen consumption in the total community. The filtered water was then distributed in two sets of water samples: an unfiltered water sample that served to assess total community respiration and a water sample filtered onto a 0.6-µm pore size Nuclepore membrane. Filtration was done under low differential pressure (<100 mm Hg) to avoid disruption of fragile cells. Samples were then poured in 250 mL glass vials hermetically closed by pierced silicon stoppers into which were inserted the microprobes and were incubated at ± 1°C in situ temperature in the dark. Gentle homogenization of the water was achieved by use of a magnetic stirrer. Incubation vessels, microprobes, stoppers, and stirrers were acid-washed (hydrochloric acid, 10% final volume) before each experiment.

Respiration was continuously measured by oxygen microprobes. The microprobes (Unisense, Denmark) are designed with an exterior guard cathode (Revsbech 1989), which results in extremely low oxygen consumption by the electrodes themselves (4.7 to 47 × 10^{-7} mmol O_2 h^{-1}). Probes have a response time shorter than 1 s and a precision of 0.1 µM. Oxygen concentration was collected by a computer every 10 s during 14 h (Sainte Marie and Grande Rade samples) or 24 h (open lagoon samples). Bacterial respiration was estimated from oxygen consumption in the 0.6-µm filtered water sample. Bacterial respiration was computed from the slope of O_2 versus time measured during a 5-h period, which we assumed to be sufficiently short to minimize bacterial production and abundance changes. The starting point was chosen from observation of significant oxygen decrease (0.5 µM). Oxygen consumption was converted to carbon respired (µgC L^{-1} h^{-1}) assuming a respiratory quotient of 1.

Chlorophyll a—Chorophyll *a* concentration from unfiltered samples was determined after filtration onto GF/F filters immediately stored at –20°C until analysis. Chlorophyll *a* concentration was later estimated fluorometrically according to Yentsch and Menzel method (1963). Pigments concentrations were computed from Lorenzen (1966), modified by Jeffrey and Humphrey (1975).

Bacterial abundance—Bacterial abundance was estimated from samples immediately preserved with borax-buffered formalin (2% final concentration), filtered onto 0.2 µm black polycarbonate membrane, stained with DAPI (4′6-diamidino-2-phenylindole), and stored at –20°C until enumeration epifluorescence microscopy. More than 400 bacteria were counted in at least 20 fields in duplicates to obtain a coefficient of variation of 10% (Kirchman et al. 1982). Bacterial

abundance was determined at the beginning and at the end of each respiration incubation.

Incorporation of ^{3}H-thymidine—Bacterial DNA synthesis, a proxy of the bacterial production was measured by the incorporation of ^{3}H-thymidine into cold trichloroacetic acid (TCA) precipitable material. Duplicate or triplicate 5 to 10 mL water samples were incubated in the dark with ^{3}H-[*methyl*]thymidine (final concentration 15 nM, 1.8 TBq mmol^{-1}, Amersham) for 1 h at in situ temperature (±1°C). Previous experiments have shown that saturation is always obtained at this concentration. The activity was stopped by the addition of buffered formalin (2% final concentration). Labeled material was collected by filtration under low pressure (<100 mm Hg) through a 0.2-µm polycarbonate membrane and allowed to precipitate 15 min at 4°C with ice-cold TCA (5% w/v). Membranes were rinsed 3 times with 5 mL cold 5% TCA. DNA was then hydrolyzed by heating at 100°C for 30 min with 0.5 N HCl. After addition of 4 mL of scintillation cocktail, radioactivity was measured with a Packard TriCarb scintillation counter after quench correction. Bacterial DNA synthesis was determined at the beginning and at the end of each respiration incubation. Rates of ^{3}H-thymidine incorporation were converted to cell production using a conversion factor of 2.91 × 10^{18} cells mol^{-1} thymidine (Jacquet unpubl. data unref.).

BGE determination—Generally, BGE is computed from bacterial production estimated from thymidine or leucine incorporation determined from short incubation time (i.e., ~ 1 h) and from bacterial respiration measured over 24 h incubation (using Winkler titration of O_2). In this study, BGE was computed from:

$$BGE(\%) = \frac{BBP_{net}}{(BBP_{net} + BR)} \times 100 \quad (1)$$

with BBP_{net} being net bacterial biomass production, i.e., the difference of bacterial biomass between the beginning and the end of the incubation time considered, and BR, bacterial respiration, converted in carbon units. Conversion of bacterial abundance (10^6 cell mL^{-1}) to carbon biomass (µg C L^{-1}) was done using a conversion factor of 20 fgC cell^{-1} (Lee and Fuhrman 1987), although considerable uncertainties remain on this factor (Fukuda et al. 1998).

Assessment

Methodological approach—Oxygen consumption of the probes. In order to insure that oxygen consumption by the microprobes was negligible compared to bacterial consumption, we monitored oxygen concentration in 0.6-µm and 0.2-µm filtered subsamples of the same water in parallel incubations during 24 h (Fig. 2). Oxygen concentration in 0.2-µm filtered water was constant (215 µM O_2, Fig. 2) from 0 to 15 h of incubation. The decrease observed after 15 h of incubation was caused by growth of residual small bacteria, which passed through the filter, and/or contamination of the sample because the apparatus could not be autoclaved. This residual

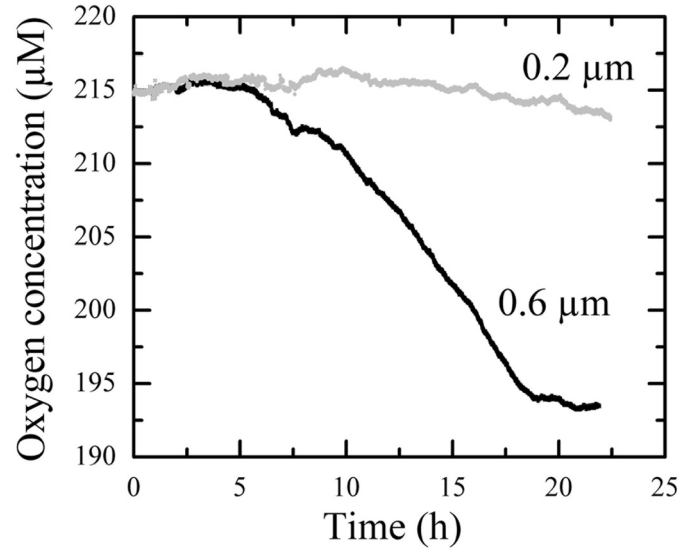


Fig. 2. Oxygen concentration during dark incubation in 0.6- and 0.2-µm filtered subsamples of station N12 (6 May 03).

contamination is negligible for samples filtered on 0.6 µm (Fig. 2) containing most of the bacteria (average 90% ± 4%, n = 31, Torréton et al. unpubl. data unref.). The absence of oxygen consumption by the microprobes is a considerable advantage, because most of the oxygen-measuring equipment used in planktonic waters involve oxygen macroprobes (Griffith 1988; Langdon 1993), which exhibit an internal oxygen consumption, leading to an overestimation of the oxygen consumption unless corrected.

Reproducibility. Oxygen consumption estimates using the Winkler method are usually performed in replicates. In our study, the availability of the equipment to measure oxygen concentration prevented us from estimating O_2 consumption systematically in replicates. However, on several occasions, we checked reproducibility in duplicate water samples. Fig. 3 shows that the time course of oxygen concentration is very similar in two samples of the same station.

Precision of the oxygen microprobe. Table 2 presents different techniques used to measure oxygen concentration in planktonic systems. The Winkler technique is the most commonly used, and many works have been performed to increase the precision of this chemical determination of oxygen concentration. The precision of oxygen microprobe (0.05%) is equivalent to highly precise Winkler techniques described by Roland et al. (1999) and by Sherr and Sherr (2003).

Trend of respiration in <0.6-µm filtered samples—A major drawback of discrete O_2 or CO_2 measurements to estimate respiration is that they require rather long incubation times to observe significant differences with initial oxygen concentration. Oxygen consumption is then assumed to be linear, and this is usually not easy to verify on short time scales using Winkler titration. In a previous study, Pomeroy et al. (1994)

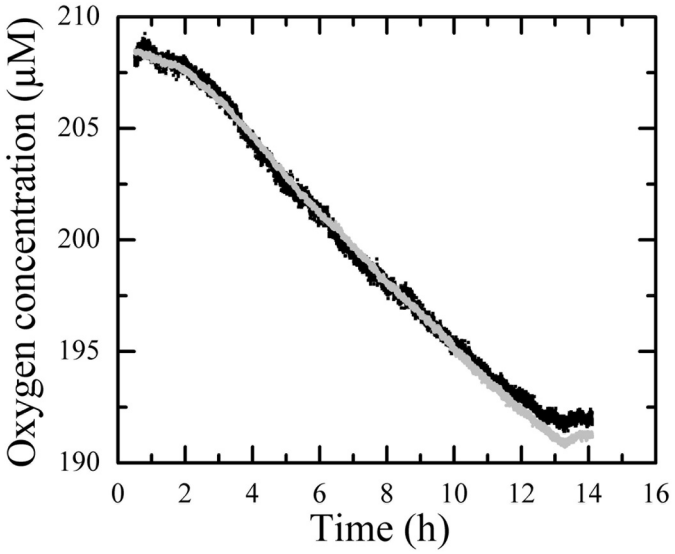


Fig. 3. Oxygen concentration during dark incubation in duplicate 0.6-µm filtered subsamples of station N12 (10 Apr 03).

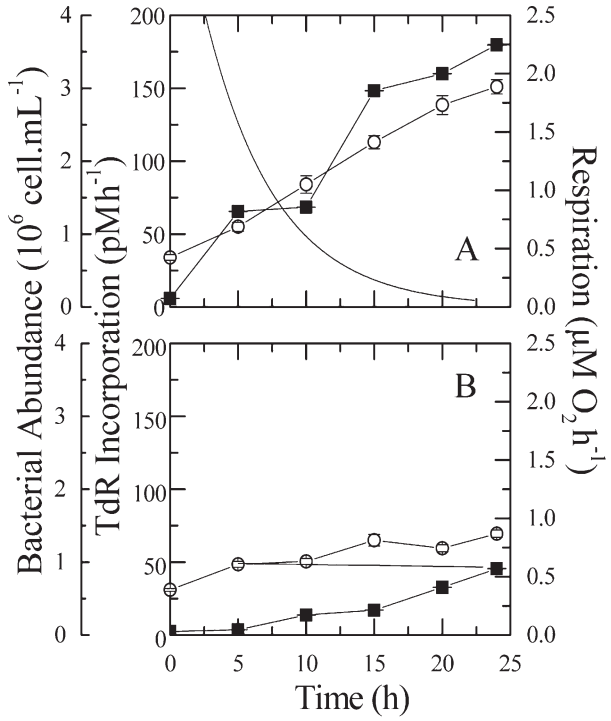


Fig. 4. Bacterial abundance (○), TdR incorporation (■), and respiration (—) of 0.6 µm filtrates from a eutrophic, D01 (A), and oligotrophic site, M10 (B). The bars represent standard deviation.

observed different trends of oxygen concentration time course during 24 h incubations with discrete oxygen measurements every 5 h. One third of their data did not show a linear decrease of oxygen concentration as a function of time. Therefore, they suggest a continuous monitoring of oxygen concentration for a better estimation of the bacterial respiration.

The use of oxygen microprobes allowed us to follow continuously the oxygen concentration in the respiration bottles. Oxygen concentration data versus time were then fitted to an exponential decay equation, and the time course of respiration were then calculated from the first derivative of the fitted function. In parallel, ^{3}H-thymidine incorporation and bacterial abundance were determined every 5 h during the 24 h dark incubation on replicate 0.6-µm filtered samples. Fig. 4 presents the time course of respiration, bacterial abundance, and bacterial production in two contrasted trophic situations (M10, oligotrophic site, and D01, eutrophic site, see Fig. 1).

A significant respiration appeared only after 2 to 3 h in the eutrophic site sample (Fig. 4A), whereas it appeared only after 8 to 10 h in the oligotrophic site sample (Fig. 4B).

In D01 (Fig. 4A), TdR incorporation rate increased considerably, from 6 to 180 pM h^{-1} in 24 h of incubation. Bacterial abundance at the end of incubation reached up to 5 times initial value. Respiration was maximal after 2 h of incubation (2.5 µM O_2 h^{-1}), and then decreased until becoming practically null after 15 h of incubation. The increase in TdR and bacterial abundance suggest that bacteria were likely not resource limited. The observed discrepancies between production and con-

Table 2. Different methods to measure oxygen concentration in planktonic environments

Methodology	Precision (%)	Precision* (µM)	Measurements	Reference
Winkler	0.12	0.28	Discrete	Sherr and Sherr (2003)
Winkler	0.03	0.07	Discrete	Smith and Prairie (2004)
Winkler	0.1 to 0.8	0.23 to 1.85	Discrete	Roland et al. (1999)
Mass spectrometry	<0.5	<1.15	Discrete	Kana et al. (1994)
Oxygen macroprobe	0.3	0.8	Continuous	Langdon (1993)
Oxygen macroprobe	0.65-1.52	1.5-3.5	Continuous	Coffin et al. (1993)
Respirometer	0.3	0.8	Continuous	Griffith (1988)
Respirometer	1	2.3	Continuous	Taylor et al. (2003)
Oxygen microprobe	0.05	0.1	Continuous	This study

*Precision in µM corresponds to the precision calculated for an oxygen concentration of 230.9 µM (oxygen solubility at 20°C and 35‰)

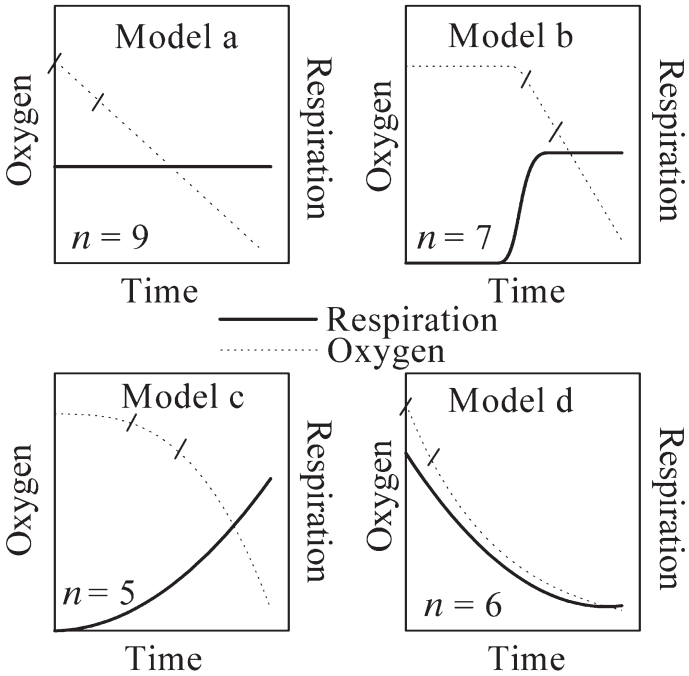


Fig. 5. Representation of the different trends of the time course of the oxygen concentration and the predicted respiration versus time. *n* represents the number of corresponding cases observed during our study. The two lines indicate the interval (5 h) used to calculate the bacterial respiration. For models b and c, the starting point was set from a minimum decrease of 0.5 µM O_2 (*see* text).

sumption indicate a temporal uncoupling between both processes as suggested by del Giorgio and Cole (1998).

The sample from the oligotrophic site (Fig. 4B) displayed an increase in thymidine incorporation after a lag phase of a few hours. Similarly, significant respiration was only measurable after a lag phase of 6 h and the rate (0.6 µM O_2 h^{-1}) remained almost constant during the next 15 h, whereas thymidine incorporation rate kept increasing until reaching 45 pM TdR h^{-1} at the end of incubation. Bacterial abundance increased 2.5-fold for the first 15 h and reached a plateau near 1.4×10^6 cell mL^{-1}.

These results allowed the optimization of incubation times to measure oxygen consumption by heterotrophic bacteria in oligotrophic and eutrophic sites. Additionally, parallel trends in ^{3}H-thymidine incorporation and bacterial abundance documented the limits of this method. In fact, interpretation of the results should be made with caution, considering that what is measured is more representative of process occurring during incubation in bottles rather than initial in situ conditions.

Results from station M10 show that significant oxygen consumption was only observed when bacterial abundance and activity increased. This increase in activity can result from both release of predation by >0.6 µm organisms, enrichment by disruption of fragile cells during filtration, bottle effect like adsorption and concentration of the organic matter on glass material, or by changes of bacterial communities during incubations (Schäfer et al. 2000; Massana et al. 2001; Fuchs et al. 2000; Gattuso et al. 2002). Biddanda et al. (1994) have already shown such increases of bacterial abundance and activity during incubation in waters from the northern Gulf of Mexico of various trophic status. In their study, at the end of 20 h incubations, bacterial production increased up to 12- and 8-fold in highly productive shelf waters and in less productive slope waters, respectively. Likewise, bacterial abundance in the eutrophic site increased 1.5-fold, whereas it remained constant in the oligotrophic site. Consequently, during these incubations the community evolves and activity measurements are not truly representative of initial conditions.

It is therefore highly preferable to incubate during the shortest period to stay the closest to initial conditions. Hence, we have chosen to measure the bacterial respiration with the slope calculated on a 5-h interval. This time was the best compromise between the minimum time to ensure a significant decrease of oxygen concentration and a minimized increase of bacterial rate of DNA synthesis (1.19 ± 0.21 fold) and abundance (1.42 ± 0.09 fold). The beginning of the interval was chosen as soon as we observed a significant decrease of oxygen.

Continuous O_2 measurements versus discrete O_2 measurements—We collected a total of 27 samples from 16 stations of contrasted trophic status (Table 1). Fig. 5 shows the different time courses of oxygen concentration observed during our study. Fig. 6 presents the comparison between the discrete method and the continuous method for the estimation of bacterial respiration.

Only 9 of 27 cases presented a constant O_2 consumption during incubation (model a, Fig. 5 and Fig. 6) and, hence, do not show important bias to compute bacterial respiration. In model a, discrete methods to estimate bacterial respiration

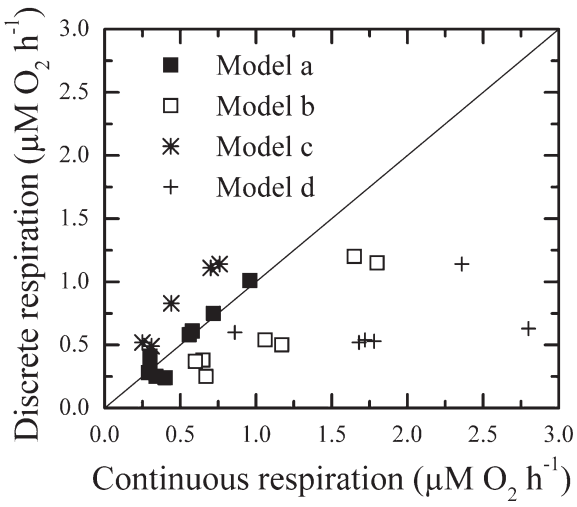


Fig. 6. Comparison of the respiration estimated from discrete and continuous O_2 measurements. For the discrete approach, respiration was calculated from the difference between the oxygen concentration at the beginning and at the end of the incubation (14 h or 24 h).

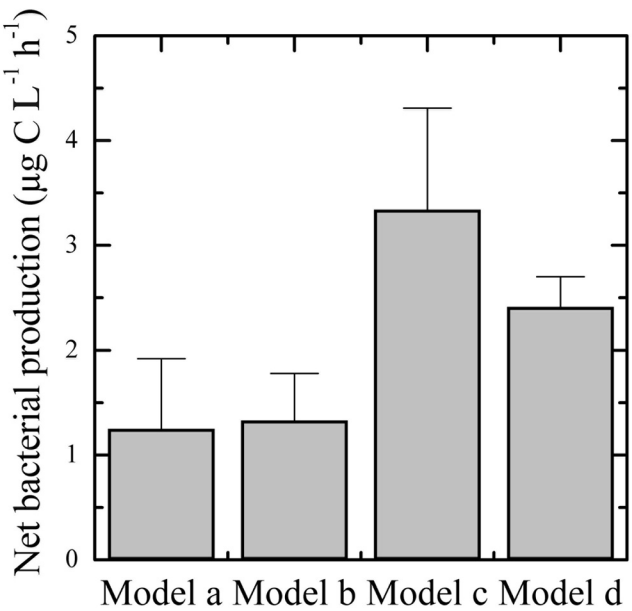


Fig. 7. Distribution of the average net bacterial biomass production as a function of the model of oxygen consumption observed during incubation. Error bars represent the standard deviation.

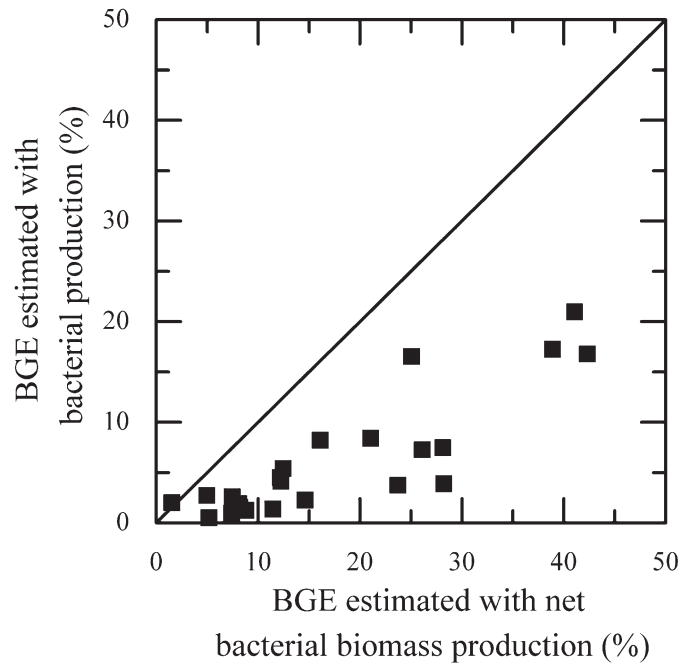


Fig. 8. Relationship between BGE estimated with the net bacterial biomass production (BGE_{BBPnet}) and the BGE estimated with the bacterial production determined by the ^{3}H-thymidine incorporation (BGE_{BP}).

would give results similar to those estimated by continuous monitoring of oxygen concentration. This model characterized respiration of water samples displaying a low net bacterial production (Fig. 7).

Model b presents a 5- to 10-h lag phase before oxygen decrease. This model was, in general, characteristic of the oligotrophic samples (4 of 7) from the open lagoon transect (Fig. 1). In model b, respiration estimated by the discrete method would result in an underestimation of the oxygen consumption rates (Fig. 6). As observed for model a, model b is characteristic of water samples exhibiting a low net bacterial production (Fig. 7). In model c, consumption increases as a function of time due to increasing biomass and production. The discrete method would therefore overestimate BR compared to continuous oxygen recording during the 5-h time interval (Fig. 6). Samples respiring according to model c are characterized by the highest net bacterial production (Fig. 7). Finally, in model d, the slope is maximal at the beginning of the incubation and decreases thereafter. This trend is characteristic of rather eutrophic sites and may be explained by an exhaustion of the trophic resources and subsequent decrease of the heterotrophic bacterial activity. For model d, the discrete method for the estimation of the bacterial respiration would result in a lower rate than the value determined using continuous monitoring (Fig. 6).

These different models show the great variability of oxygen kinetics and therefore the difficulty in choosing how to compute the bacterial oxygen consumption. Similarly, in a previous study, Pomeroy et al. (1994) observed 4 different oxygen trends from discrete oxygen measurements performed during 24 h incubation. Even if, in our study, the models a/b and c/d can be assigned to water of different trophic status as revealed by bacterial net production of biomass (Fig. 7), we cannot assign one model to any characteristic site. This result emphasizes the need to monitor continuously the oxygen consumption of planktonic microorganisms in order to assess respiration rates with minimum biases.

Estimation of BGE—BGE is most often determined from a proxy of bacterial production (measured with ^{3}H-leucine or ^{3}H-thymidine incorporation) computed with bacterial respiration. In our study, we estimated the net bacterial biomass production from the change of abundance observed during the incubation used for the bacterial respiration determination (*see* Materials and procedures). This way, both processes that govern BGE are determined under the same conditions. Fig. 8 presents the relationships between the BGE estimated with the net bacterial biomass production (BGE_{BBPnet}) and the BGE estimated with the bacterial production determined from ^{3}H-thymidine incorporation (BGE_{BP}). Except for one station, BGE_{BBPnet} is always higher than BGE_{BP}. BGE_{BBPnet} and BGE_{BP} can be correlated using a linear regression ($R^2 = 0.75$, $n = 24$, $P < 0.001$) with the following equation:

$$BGE_{PB} = 0.4323 \times BGE_{BBPnet} - 1.4829 \quad (2)$$

This trend would suggest that when BGE is estimated from the bacterial production estimated from tracer incorporation, it would result in an underestimation of the bacterial growth

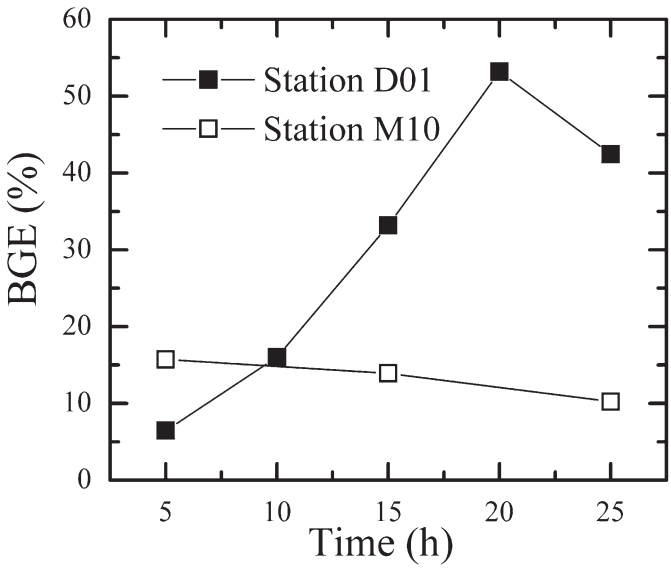


Fig. 9. Time course of BGE during a 24-h incubation in two contrasted trophic status. Data used to compute BGE are from Fig. 4. For station M10, the calculation of the net biomass production was performed under a 10-h interval to get a significant change in bacterial abundance.

efficiency. This underestimation might be due to the discrepancy in incubation time to determine both processes (1 h for TdR-derived bacterial production versus 12 to 24 h for the net bacterial biomass production).

The 24-h incubation used to estimate BGE could lead to strong changes of the biomass and bacterial production as shown in Fig. 4. These changes in bacterial biomass and production can strongly affect the determination of the BGE. Fig. 9 presents the time course of the BGE during 24-h incubation computed from the data presented in Fig. 4. At the eutrophic site (D01), BGE was equal to 7% at the beginning of incubation, and strongly increased with time to reach a maximum value of 53% after 20 h of incubation. This increase in BGE is due to the strong decrease in the respiration rate during the incubation, concomitant with a constant net biomass bacterial production (Fig. 4A). Coffin et al. (1993) have observed similar patterns for bacterial abundances and respiration during 24 h incubations leading to a regular increase in BGE. Similarly, Pomeroy et al. (1994) have observed a decrease in oxygen respiration (using multi-point Winkler titration) concomitant with a regular increase in bacterial production determined from leucine incorporation. These observed time courses of both processes result in a regular increase in BGE during incubation. High initial respiration rates concomitant with low bacterial production (resulting in a low BGE value) could indicate that both processes are not coupled as previously suggested by del Giorgio and Cole (1998).

In contrast, at the oligotrophic site M10, respiration and net bacterial biomass production were constant with time (Fig. 4B). As a consequence BGE did not exhibit significant variations during incubation (Fig. 9). Possible variations of BGE during a 24-h incubation, such as those observed for the eutrophic site, emphasize the necessity to reduce as much as possible the time of incubation in order to minimize the bias in the BGE determination.

Discussion

The Winkler technique is the most commonly used technique to estimate bacterial respiration in planktonic systems. This technique offers high sensitivity (*see* Table 2), however it has the disadvantage of preventing the continuous monitoring of oxygen concentration with time. Respiration is most often computed from the difference between initial and final oxygen concentrations assuming a linear decrease of oxygen during incubation. Previous studies have already shown that oxygen decrease in long incubation is not always linear but can exhibit different patterns like exponential decay or exponential increase (Biddanda et al. 1994; Pomeroy et al. 1994). In addition, despite a high sensitivity, long incubation times are often required to detect significant respiration rates, especially in oligotrophic waters where incubations can reach up to 36 h. The main consequences of these long incubations are well documented; this includes changes in bacterial number and activity (*see* del Giorgio and Cole 1998, for a review) but also changes in the community composition (Massana et al. 2001; Gattuso et al. 2002).

The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration can solve one of the main problems encountered with discrete measurements: the monitoring of the oxygen decrease during dark incubations. Among the 27 measurements performed in this study, only 9 of them exhibited a linear decrease of oxygen concentration, the others show trends that were somehow related to the trophic status of the water. This monitoring offers two main advantages. First, by following the oxygen concentration versus time, it is possible to detect the onset of significant oxygen consumption. Oxygen microprobes do not consume oxygen due to the implementation of a guard cathode (Revsbech 1989) and exhibit a high precision around 0.1 μM of O_2, a value that is similar to the one observed in high precision Winkler measurements (*see* Table 2). However this high sensitivity is counterbalanced by the background noise, which often occurs during oxygen measurements with a microprobe. As a consequence, this theoretical precision of 0.1 μM is in practice reduced to 0.5 μM of O_2 for oxygen measurements performed in planktonic waters.

The second advantage is that, as soon as a significant oxygen decrease is noticed, it is possible to considerably reduce the time of incubation and therefore stop the incubation when enough data points have been recorded. Thus, by minimizing bottle effects and the concomitant community changes, measurements are performed under conditions that remain the closest possible to the initial in situ conditions.

The precision of the oxygen microprobes is however not sufficient enough to measure bacterial respiration in olig-

otrophic waters with a short incubation time. Monitoring of oxygen concentration in oligotrophic waters has demonstrated that oxygen decrease became measurable by the oxygen microprobe only after bacterial activity and biomass increased during the incubation (Fig. 4B). This clearly shows that measurements of respiration in such waters are still problematic since, at the present time, there is no technique with sensitivity sufficient enough to detect these very low in situ respiration rates. Gattuso et al. (2002) have proposed the applications of alternative techniques, which would offer higher oxygen sensitivity and therefore potentially considerably reduce the incubation time such as the use of membrane inlet ion trap mass spectrometry (Cowie and Lloyd 1999), to estimate rates of respiration.

Comments and recommendations

The determination of BGE requires the estimation of bacterial production. This is generally done by measuring the rate of protein or DNA synthesis, using radiolabeled leucine or thymidine, although the changes in bacterial abundance and size can also be used. Estimation of bacterial production from the incorporation of radiotracers can be performed with very short incubation times and is considered as a good proxy of the in situ rate. However, BGE is afterward computed from bacterial respiration estimated over incubation times longer than those used for the determination of bacterial production. BGE is therefore computed from the rate of two metabolic processes estimated in two different incubation conditions, which is likely to bias it (i.e., the production rate measured over a short-time interval may not correspond to the respiration rate over a much longer time scale). The estimation of net bacterial production from the changes of bacterial abundances during the incubations for respiration measurements can be an alternative solution. By using a non-destructive method to measure oxygen change, sub-samples can be obtained at the end of the incubation to determine the net bacterial biomass production. This way both processes would be estimated with the same time scale and the same conditions of incubation.

The possibility to reduce incubation length by continuous monitoring of oxygen changes during bacterial respiration measurements needs the determination of the net bacterial biomass production with a sufficient accuracy. To achieve the required sensitivity, determination of bacterial counts using epifluorescence microscopy will require the enumeration of a large number of bacteria and the use of several replicates, especially in oligotrophic waters. This will dramatically increase the workload associated with the measurements. Flow cytometry might be an alternative technique to determine net bacterial biomass production during respiration incubations. This technique offers the possibility to measure bacterial numbers with a higher sensitivity compared to epifluorescence microscopy (Troussellier et al. 1999; Lemarchand et al. 2001). In addition, flow cytometry can be used to estimate the biovolume of the cells, or even the protein content (Zubkov et al. 1999), at the beginning and at the end of the incubation and thus, allows a better calculation of the net bacterial production, since changes in the biovolume of bacterial cells have been often reported during incubation for BGE determination (Gattuso et al. 2002).

References

Amon, R. M. W., and R. Benner. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. Limnol. Oceanogr. 41:41-51.

Barillier, A., and J. Garnier. 1993. Influence of temperature and substrate concentration on bacterial growth yield in Seine River water batch cultures. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1678-1682.

Biddanda, B., S. Opsahl, and R. Benner. 1994. Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton on the Louisiana shelf. Limnol. Oceanogr. 39:1259-1275.

Bjornsen, P. K. 1986. Bacterioplankton growth yield in continuous seawater cultures. Mar. Ecol. Prog. Ser. 30:191-196.

Bouvier, T. C., and P. A. del Giorgio. 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. Limnol. Oceanogr. 47:453-470.

Carlson, C. A., and H. W. Ducklow. 1996. Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. Aquat. Microb. Ecol. 10:69-85.

Cho, B. C., and F. Azam. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. Nature 332:441-443.

Coffin, R., J. Connolly, and P. S. Harris. 1993. Availability of dissolved organic carbon to bacterioplankton examined by oxygen utilization. Mar. Ecol. Prog. Ser. 101:9-22.

Cowie, G., and D. J. Lloyd. 1999. Membrane inlet ion trap mass spectrometry for the direct measurement of dissolved gas in ecological samples. J. Microbiol. Meth. 35:1-12.

Daneri, G., B. Riemann, and P. J. L. Williams. 1994. In situ bacterial production and growth yield measured by thymidine, leucine and fractionated dark oxygen uptake. J. Plankt. Res. 16:105-113

del Giorgio, P. A., and T. C. Bouvier. 2002. Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. Limnol. Oceanogr. 47:471-486.

——— and J. J. Cole. 1998. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. Annu. Rev. Ecol. Syst. 29:503–541.

Douillet, P. 1998. Tidal dynamics of the south-west lagoon of New-Caledonia: observations and 2D numerical modeling. Oceanologica Acta 21:69-79.

Ducklow, H. W., and C. A. Carlson. 1992. Oceanic bacterial production. Adv. Microb. Ecol. 12:113-181.

Fuchs, B. M., M. V. Zubkov, K. Sahm, P. H. Burkill, and R. Amann. 2000. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow

cytometric and molecular biological techniques. Environ. Microbiol. 2:191-201.

Fuhrman, J. A. 1992. Bacterioplankton role in cycling of organic matter: the microbial food web, p. 361-383. In: P. G. Falkowski and A. D. Woodhead [eds.], Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum Press, New York.

Fukuda, R., H. Ogawa, T. Nagata, I. Koike. 1998. Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. Appl. Environ. Microbiol. 64:3352-3358.

Gattuso, J. P., S. Peduzzi, M. D. Pizay, and M. Tonolla. 2002. Changes in freshwater bacterial community composition during measurements of microbial and community respiration. J. Plankt. Res. 24:1197-1206.

Griffith, P. C. 1988. A high-precision respirometer for measuring small rates of change in the oxygen concentration of natural waters. Limnol. Oceanogr. 33:632-638.

———, D. J. Douglas, and S. C. Wainright. 1990. Metabolic activity of size-fractionated microbial plankton in estuarine, nearshore and continental shelf waters of Georgia. Mar. Ecol. Prog. Ser. 59:263-270.

Hobbie, J. E., and C. C. Crawford. 1969. Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. Limnol. Oceanogr. 14:528-532.

Jeffrey, S. W., and G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, c_1 and c_2 in algae, phytoplankton and higher plants. Biochem. Physiol. Pflanz. 167:191-194.

Jorgensen, N. O. G., N. Kroer, and R. B. Coffin.1994. Utilization of dissolved nitrogen by heterotrophic bacterioplankton: effect of substrate C/N ratio. Appl. Environ. Microbiol. 60:4124-4133.

Kana, T., C. Darkangelo, M. D. Hunt, J. B. Oldham, G. E. Bennett, and J. C. Cornwell. 1994. Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N_2, O_2, and Ar in environmental water samples. Anal. Chem. 66:4166-4170.

Kirchman, D. L., J. Sigda, R. Kapuscinski, and R. Mitchell. 1982. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 44:376-382.

Kroer, N. 1993. Bacterial growth efficiency on natural dissolved organic matter. Limnol. Oceanogr. 38:1282-1290.

Langdon, C. 1993. Community respiration measurements using a pulsed O_2 electrode, p. 447-453. In: P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole [eds.], Handbook of methods in aquatic microbial ecology, Lewis Publisher.

Lee, S., and J. A. Furhman. 1987. Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. 53:1298-1303.

Lemarchand, K., N. Parthuisot, P. Catala, and P. Lebaron. 2001. Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. Aquat. Microb. Ecol. 25:301-309.

Lemée, R., E. Rochelle-Newall, F. Van Wambeke, M. D. Pizay, P. Rinaldi, and J. P. Gattuso. 2002. Seasonal variation of bacterial production, respiration and growth efficiency in the open NW Mediterranean Sea. Aquat. Microb. Ecol. 29:227-237.

Lorenzen, C. J. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. Deep-Sea Res. 13:223-227.

Massana, R., C. Pedros-Alio, E. O. Casamayor, and J. M. Gasol. 2001. Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. Limnol. Oceanogr. 46:1181-1188.

Middelboe, M., and M. Sondergaard. 1993. Bacterioplankton growth yield: seasonal variations and coupling to substrate lability and β-glucosidase activity. Appl. Environ. Microbiol. 59:3916-3921.

———, B. Nielsen, and M. Sondergaard. 1992. Bacterial utilization of dissolved organic carbon (DOC) in coastal waters—determination of growth yield. Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol. 37:51-61.

Pomeroy, L. R., W. J. Wiebe, D. Deibel, R. J. Thompon, G. T. Rowe, and J. D. Pakulski. 1991. Bacterial responses to temperature and substrate concentration during the Newfoundland spring bloom. Mar. Ecol. Prog. Ser. 75:143-159.

———, J. E. Sheldon, and W. M. Sheldon. 1994. Changes in bacterial numbers and leucine assimilation during estimations of microbial respiratory rates in seawater by the precision Winkler method. Appl. Environ. Microbiol. 60: 328–332.

———, J. E. Sheldon, W. M. Sheldon, and F. Peters. 1995. Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. Mar. Ecol. Prog. Ser. 117:259-268.

Pradeep Ram, A. S., S. Nair, D. Chandramohan. 2003. Bacterial growth efficiency in the tropical estuarine and coastal waters of Goa, southwest coast of India. Microb. Ecol. 45: 88-96.

Revsbech, N. P. 1989. An oxygen microsensor with a guard cathode. Limnol. Oceanogr. 34:472-476.

Roland, F., N. F. Caraco, and J. J. Cole. 1999. Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: Evaluation of interference from color and turbidity. Limnol. Oceanogr. 44:1148-1154.

Schäfer, H., P. Servais, and G. Muyzer. 2000. Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. Arch. Microbiol. 173:138-145.

Sherr, B. F., and E. B. Sherr. 2003. Community respiration/production and bacterial activity in the upper water column of the central Arctic Ocean. Deep-Sea Res. Part I 50:529-542.

Smith, E. M., and Y. T. Prairie. 2004. Bacterial metabolism and growth efficiency in lakes: The importance of phosphorus availability. Limnol. Oceanogr. 49:137-147.

Taylor, G. T., J. Way, and M. Scranton. 2003. Planktonic carbon cycling and transport in surface waters of the highly urbanized Hudson river estuary. Limnol. Oceanogr. 48: 1779-1795.

Troussellier, M., C. Courties, P. Lebaron, and P. Servais. 1999. Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. FEMS Microbiol. Ecol. 29:319-330.

Tulonen, T, Salonen K, Arvola L. 1992. Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. Hydrobiologia 229:239-252.

Yentsch, C. S., and D. W. Menzel. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. Deep-Sea Res. 10:221-231.

Zweifel, U. L., B. Norrman, and A. Hagström. 1993. Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. Mar. Ecol. Prog. Ser. 101: 23-32.

Zubkov, M. V., B. M. Fuchs, H. Eilers, P. H. Burkill, and R. Amann. 1999. Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 65:3251-3257.

Submitted 18 May 2004
Revised 29 October 2004
Accepted 15 November 2004

Résumés

ABSTRACT

Characterized by oligotrophic to mesotrophic waters, the SW lagoon of New Caledonia receives an important part of urban effluents from the city of Nouméa. The aim of this work was to assess the response of phytoplankton and bacterioplankton communities to nutrient inputs in this coastal tropical lagoon.

An annual survey showed a weak seasonality of phytoplankton and bacterioplankton biomass and production with maximal values in December-January (austral summer) and April-May, and minimum values in August (austral winter). This seasonal trend is overlaid by important short term variations of these variables that most likely originate from wind-induced renewal of lagoon waters.

As gradients in nutrient concentrations in the vicinity of Nouméa City are observed during these 3 characteristic periods, these periods were chosen in order to assess the response of bacterioplankton and phytoplankton to nutrient enrichment. Nitrogen was the element limiting phytoplankton production.

Phytoplankton biomass and production increase with increasing nutrient concentration as does phytoplankton average size. Bacterioplankton production increases proportionally more than primary production, with bacterioplankton carbon demand largely exceeding particulate primary production at the most eutrophic stations.

Within the picophytoplankton, *Prochlorococccus* dominates in the surrounding oceanic and oligotrophic lagoon waters. However, in the most eutrophicated sites *Synechococcus* and picoeukaryotic phytoplankton are the dominant species. Among the nano- and microphytoplankton, the dominance of the coccolithophorids and dinoflagellates in oligotrophic waters is replaced by diatom-dominated populations at the most eutrophicated stations.

Bacterioplankton community structure assessed using T-RFLP does not exhibit important spatial variations for both free-living and particle-attached bacteria, except in some nutrient-rich head of the bay stations. Free-living bacterioplankton community structure appeared to be stable and independent of bacterial production variations throughout a year long survey at a station considered representative of average lagoon conditions. Conversely, particle-attached bacteria display important temporal variations in community structure.

Keywords : microbial food web – phytoplankton – activity – diversity – nutrients – eutrophication – oligotrophic – tropical lagoon – New Caledonia

Jacquet, S - Impact des apports en nutriments sur le réseau trophique planctonique dans le lagon sud-ouest de Nouvelle-Calédonie

RESUME

Caractérisé par des eaux oligotrophes à mésotrophes, le lagon Sud Ouest de Nouvelle-Calédonie reçoit une part importante des effluents urbains de la ville de Nouméa. L'objectif de ce travail était d'évaluer les réponses des communautés phytoplanctoniques et bactériennes aux apports en nutriments dans ce système côtier lagonaire tropical.

Un suivi annuel montre une faible saisonnalité des biomasses et productions bactériennes et phytoplanctoniques avec des maxima en Décembre-Janvier (été austral) et Avril-Mai et un minimum en Août, pendant l'hiver austral. Cette tendance saisonnière est entachée par d'importantes fluctuations à court terme de ces variables, vraisemblablement induites par le renouvellement des eaux lagonaires par les eaux océaniques sous l'influence du vent.

Les gradients en nutriments au voisinage de Nouméa sont observables à ces 3 périodes caractéristiques. Elles ont donc été choisies pour évaluer la réponse des communautés bactérienne et phytoplanctonique aux enrichissements en nutriments. L'azote semble être l'élément limitant la production phytoplanctonique.

La biomasse phytoplanctonique et la production primaire augmentent sensiblement en réponse aux accroissements en nutriments et cette stimulation s'accompagne d'une augmentation de la taille moyenne du phytoplancton. La production bactérienne augmente proportionnellement plus que la production primaire et la demande bactérienne en carbone excède largement la production primaire particulaire planctonique aux stations les plus enrichies.

Au sein du picophytoplancton, les *Prochlorococccus* dominent largement dans les eaux océaniques proches et aux stations lagonaires les plus oligotrophes et sont remplacés par les *Synechococcus* et des picoeucaryotes autotrophes aux sites les plus enrichis. Au sein du nano- et du microphytoplancton, les peuplements des eaux oligotrophes dominés par les coccolithophoracées et les dinoflagellés sont remplacés par des peuplements où les diatomées prédominent aux sites les plus eutrophisés.

La structure des communautés bactériennes étudiée par T-RFLP ne montre pas de variations spatiales importantes des communautés bactériennes libres et attachées aux particules, excepté dans les fonds de baie les plus altérés par les apports nutritifs. En une station représentative des conditions lagonaires, la structure des communautés bactériennes libres reste stable au cours de l'année et n'apparaît pas liée à la production bactérienne. A l'opposé, la structure des communautés bactériennes attachées aux particules montre d'importantes variations à court terme.

Mots clés : réseau trophique microbien – phytoplancton – activité – biomasse – diversité – nutriments – eutrophisation – oligotrophe – lagon – Nouvelle-Calédonie