
Mesure de l'Ammonium et du Carbone Inorganique Dissous

Campagne BIONOD

Mesure par Fluorescence (NH_4^+) et
Infra-Rouge (DIC)

Sommaire

1. Présentation	4
1.1. Campagne Bionod	4
1.2. Mode de prélèvement	5
1.2.1. Respiromètre	5
2. Mesure de l'ammonium	5
2.1. Principe	5
2.2. Mode opératoire	6
2.3. Résultats	6
3. Mesure du CO₂.....	7
3.1. Principe	7
3.2. Mode opératoire	7
3.3. Mesure des échantillons	8
4. ANNEXES.....	9
4.1. <u>Annexe n° 1</u> : Chambres des RAP de Bionod	9
4.2. <u>Annexe n° 2</u> : Résultats de l'ammonium de Bionod.....	11
4.3. <u>Annexe n° 3</u> : Résultats du DIC de Bionod.....	13
5. Bibliographie	16

Liste des figures et tableaux

<u>Tableau n° 1</u> : Résultats ammonium Bionod	11
<u>Tableau n° 2</u> : Calcul de densité Bionod.....	13
<u>Tableau n° 3</u> : Résultats CO ₂ Bionod	14
<u>Figure n° 1</u> : Zone de prélèvements de Bionod.....	4
<u>Figure n° 2</u> : Profil NH ₄ ⁺ Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Nodules.....	12
<u>Figure n° 3</u> : Profil NH ₄ ⁺ Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Sans nodules	12
<u>Figure n° 4</u> : Profil NH ₄ ⁺ Bionod – RAP 1 Zone Française – Faciès 0	12
<u>Figure n° 5</u> : Profil NH ₄ ⁺ Bionod – RAP 1 Zone Française – Faciès B	13
<u>Figure n° 6</u> : Profil CO ₂ Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Nodules	14
<u>Figure n° 7</u> : Profil CO ₂ Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Sans nodules.....	15
<u>Figure n° 8</u> : Profil CO ₂ Bionod – RAP 3 Zone Française – Faciès 0.....	15
<u>Figure n° 9</u> : Profil CO ₂ Bionod – RAP 4 Zone Française – Faciès B	15

1. Présentation

1.1. Campagne Bionod

Du 27 mars au 10 mai 2012, s'est déroulée la campagne océanographique franco-allemande BIONOD à bord du navire *L'Atalante*. Elle a eu lieu dans le Pacifique nord-est, dans la zone de Clarion-Clipperton, entre l'archipel d'Hawaï et la côte ouest du Mexique. Cette campagne répond en premier lieu aux engagements de la France vis-à-vis de l'Autorité internationale des fonds marins qui lui a attribuée un secteur de 75000 km² en vue de l'exploration des nodules polymétalliques. La campagne vise à décrire, comprendre et comparer la distribution des espèces dans les zones avec et sans nodules. L'objectif est de fournir les fondements scientifiques nécessaires afin d'établir une stratégie de préservation de la biodiversité profonde dans la perspective de l'exploitation potentielle des nodules riches en métaux.

Une partie du matériel organique produit à la surface des océans (environ 1-10%) sédimente vers les grandes profondeurs afin d'alimenter les organismes benthiques hétérotrophes en composés organiques. Arrivé sur le sédiment, ce matériel subit alors de multiples transformations : minéralisation, oxydation, remise en suspension et dépôt dans le sédiment permanent. Pour suivre les échanges chimiques et biochimiques entre l'eau et le sédiment sous-jacent afin de mieux comprendre le métabolisme du benthos et le cycle du carbone sur la zone à nodules du Pacifique, le respiromètre RAP2 a été utilisé quatre fois sur les différentes zones et faciès rencontrés.

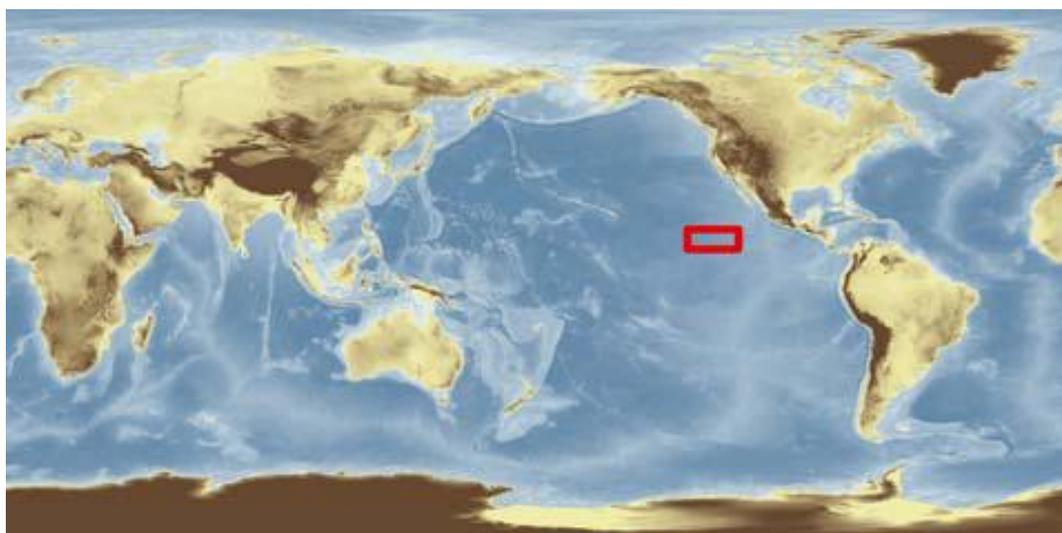


Figure n° 1 : Zone de prélèvements de Bionod

1.2. Mode de prélèvement

1.2.1. Respiromètre

Le RAP2 (Respiromètre Autonome Profond) contient plusieurs chambres benthiques où l'on étudie l'activité biologique durant un temps donné. Il permet d'obtenir les variations de concentrations d'oxygène, de dioxyde de carbone et de sels nutritifs à l'interface eau – sédiments et de calculer les flux.

Le principe de mesure du RAP2 est d'isoler et d'incuber un volume connu d'eau de mer en contact étroit avec une zone prédéterminée de sédiments de surface. Il s'agit d'un appareil autonome équipé de 3 chambres cylindriques benthiques (30cm de diamètre). Trois cellules d'échantillonnage, positionnées à l'intérieur des chambres, permettent de prélever environ 100mL d'eau homogénéisée par agitation, à des intervalles de temps prédéterminés. Immédiatement après la récupération du respiromètre, les cellules d'échantillonnage sont retirées des chambres. Les échantillons d'eau sont ensuite conditionnés dans les flacons d'analyse. Deux méthodes ont été utilisées pour mesurer la consommation d'O₂ dans les chambres du respiromètre :

- i) La concentration en oxygène dissous a été analysée par la méthode de Winkler modifiée qui est la méthode de référence utilisée au laboratoire.
- ii) Pour obtenir des données in situ avec une meilleure résolution temporelle, chaque chambre a également été équipée d'une sonde optode O₂ (Aanderaa) qui enregistre en continu la concentration en O₂ dans l'eau incubée. Les principaux avantages de cette sonde sont sa précision et sa stabilité dans le temps, et sa faible sensibilité à l'agitation (pas de consommation d'oxygène).

2. Mesure de l'ammonium

2.1. Principe

La méthode généralement utilisée pour la détermination de l'azote ammoniacal est celle au bleu d'indophénol, cette méthode n'est pas extrêmement fiable notamment pour de faibles concentrations en ammonium. La mesure par fluorescence décrite par Holmes (1999) permet la détection d'ammonium à des concentrations de l'ordre de 1µmol.L⁻¹.

Cette technique utilise un réactif appelé WR qui est un mélange de 2L de solution tampon de borate à 40 g.L⁻¹, 10mL de sulfite de sodium à 0,040 g.L⁻¹, et 100mL d'orthophthaldialdéhyde (OPA) à 50 mL.L⁻¹.

Le principe de la réaction de l'ammonium avec le réactif WR est que les ions ammonium réagissent avec l'OPA en présence d'un réducteur (sulfite) en milieu basique (pH = 9,2) tamponné par le tetraborate de sodium.

L'OPA est également utilisé pour mesurer les acides aminés mais en présence de sulfite de sodium, il devient spécifique à l'ammonium.

2.2. Mode opératoire

Tous les flacons sont rincés à l'acide chlorhydrique à 1M puis à l'eau MilliQ avant utilisation.

La gamme étalon est effectuée avec une solution mère de sulfate d'ammonium à 1mM. On complète le volume d'ammonium à 1mL avec de l'eau MilliQ, on ajoute ensuite 4mL de réactif WR. Une fois agités, les échantillons sont stockés à l'obscurité. Le temps d'incubation est de minimum 2 à 3h et ne doit pas excéder 8h pour une fluorescence optimale. Le gain est fixé à 1, l'atténuation de 16, la longueur d'onde d'excitation est de 365nm et celle d'émission de 465nm.

La salinité interfère la fluorescence, nous avons donc effectué une comparaison entre une gamme dans l'eau MilliQ et une dans l'eau de mer standard à 35‰. A la concentration choisie, la salinité n'a pas de conséquence sur la fluorescence.

Nous remarquons que les fluorescences obtenues au dessus de 100µmol/L ne sont plus linéaires, nous décidons donc de considérer que la limite de linéarité n'excède pas 75µM.

Equation de la droite d'étalonnage: $y = 0,0075 x$ pour un $R^2 = 0,9844$

Le blanc étant soustrait aux échantillons, la droite d'étalonnage passe par l'origine.

2.3. Résultats

Les teneurs en ammonium des échantillons sont présentés en Annexes n° 2. Les valeurs inférieures à la limite de quantification (<1µmol/L) ne sont pas significatives, elles ne sont donc notées qu'à titre indicatif.

On remarque que malgré des valeurs très faibles, les RAP de la zone allemande ont des valeurs légèrement plus fortes que la zone française.

3. Mesure du CO₂

3.1. Principe

La méthode utilisée est basée sur une mesure Infra Rouge décrite dans Marine Chemistry (Kaltin, 2005). Cette méthode ne dose pas uniquement le CO₂ mais la totalité du carbone inorganique dissous dans l'échantillon donc le dioxyde de carbone dissous mais aussi les carbonates et les bicarbonates.



Le dioxyde de carbone dépend de la température et de l'alcalinité totale de l'eau qui est en équilibre avec l'atmosphère.

La quantification s'effectue par rapport à une eau de mer de référence (CRM) dont la concentration en carbone inorganique dissous est certifiée (Dickson). Le batch 113 a été utilisé pour quantifier les RAP 1, 2 et 3 puis le batch 123 pour le RAP 4.

Le batch 113 a une salinité de 33,357 ‰, l'alcalinité est de 2224,65 μmol.Kg⁻¹ et le CO₂ = 2016,68 μmol.Kg⁻¹, pour une densité de 1,02351 à 20°C. Le batch 123 a une salinité de 33,384 ‰, le CO₂ = 2022,04 μmol.Kg⁻¹, pour une densité de 1,02353 à 20°C.

3.2. Mode opératoire

Les méthodes les plus utilisées pour mesurer le DIC sont basées sur l'extraction du CO₂ de l'eau naturelle. Un volume connu d'eau est acidifié par de l'acide ortho-phosphorique à 0,5 mol.L⁻¹ ce qui transforme tous les bicarbonates et carbonates en CO₂ libre, qui est ensuite transporté par un gaz vecteur (N₂) vers un détecteur Infra Rouge.

Deux burettes Metrohm[®] pompent le volume de la référence et de l'échantillon alternativement dans une cellule d'extraction avec un débit de 5 mL/min. L'acide ortho-phosphorique est ajouté à la cellule à un débit de 0,6 mL/min. Un débit constant de gaz vecteur (N₂) de 250 mL/min est réglé par un débitmètre massique Bronkhorst[®]. Le gaz passe dans la cellule et l'eau acidifiée en excès se déverse dans un petit piège situé dans une cellule à 7mm au-dessus d'un fritté. Cet excès est pompé vers l'extérieur par une pompe péristaltique. Le gaz vecteur entraîne les carbonates libérés vers le détecteur Infra Rouge LiCOR[®] (Li-820 NDIR[®]). On obtient alors des signaux du détecteur LiCOR[®]

correspondant à la fraction molaire en fonction du temps. Chaque analyse est ici répétée 2 fois, pour raison de volume pour les échantillons et 3 fois pour le CRM.

Le calcul du DIC se fait grâce à la calibration à un point obtenu par le signal de la référence de concentration en CO₂ connue. Les différents appareils de cette méthode sont contrôlés par plusieurs logiciels : le débitmètre est connecté par flowDDE[®] puis réglé par le logiciel Flowview[®], les deux burettes électroniques sont pilotées par le logiciel Tiamo[®] et la lecture et l'enregistrement des résultats obtenus par le détecteur Infra Rouge se fait sur le logiciel Li-820[®].

3.3. Mesure des échantillons

Les variations de réponses pour le C_T sont uniquement dues aux CO₂. Les valeurs indiquées correspondent donc au Carbone Inorganique Dissous Total (Annexe n° 3).

Pour les calculs des concentrations il est nécessaire de corriger les valeurs de la densité différente du CRM. Pour ce faire, nous avons déterminé la densité de chaque échantillon grâce à la température et la salinité mesurée par une CTD présente sur le ROV. Pour l'ensemble des RAP la température mesurée par optode est de 1,49°C pour une salinité de 34,69‰, soit une densité de 1,0278.

Une réaction est possible entre le CO₂ et le sédiment. Théoriquement lors de la respiration, le pH devrait diminuer et le CO₂ augmenter, or on observe que le pH augmente lui aussi. Ceci est dû à une interaction encore indéterminée.

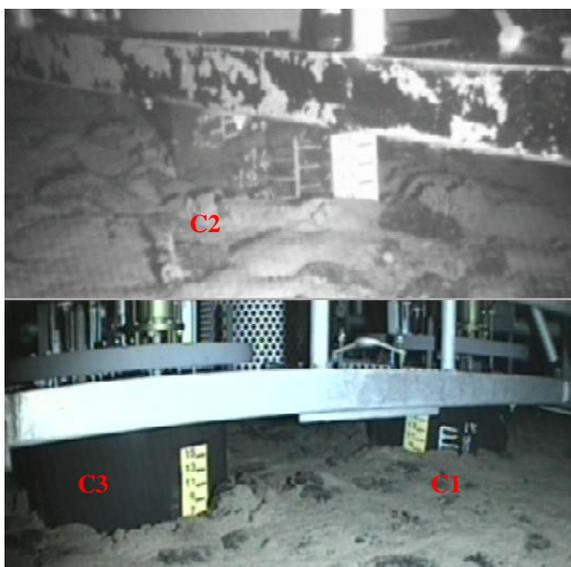
L'écart type de la mesure étant de 0,2 %, les valeurs sont à $\pm 4 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Les flux pourront être calculés sur la zone allemande (RAP 1 et RAP 2) ainsi que le RAP 4 pour la zone française. Le rapport O₂/CO₂ sera déterminé ultérieurement. Normalement, pour une mole d'oxygène consommée, une mole de dioxyde de carbone est créée. En ce qui concerne le RAP 3, les valeurs des cellules à partir de 16h d'incubation restent constantes, les résultats pour ce RAP sont donc à traiter avec précaution.

Globalement les écarts type entre les cellules d'un même temps d'incubation sont acceptables (entre 2 et 19) ainsi que les R² des pentes sont supérieurs à 0,9. De même que pour l'ammonium, les RAP incubés en zone française ne présentent pas ou peu d'activité, contrairement à la zone allemande. La zone à nodule (RAP 1) présente une activité biologique plus importante que la zone sans nodules (RAP 2).

4. ANNEXES

4.1. Annexe n° 1 : Chambres des RAP de Bionod



Bionod - RAP 1 - Zone Allemande – Nodules



Bionod - RAP 2 - Zone Allemande - Sans nodule



Bionod - RAP 3 - Zone Française - Faciès 0

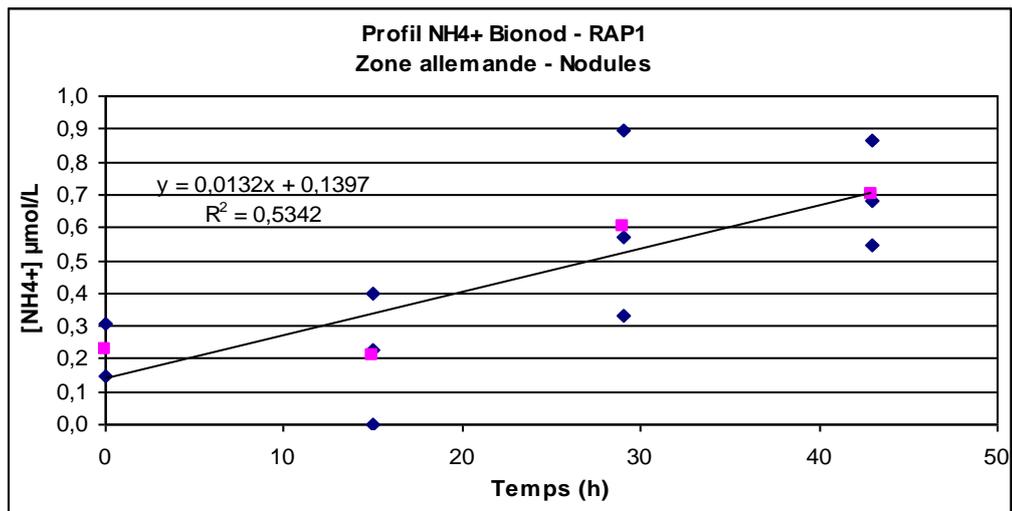
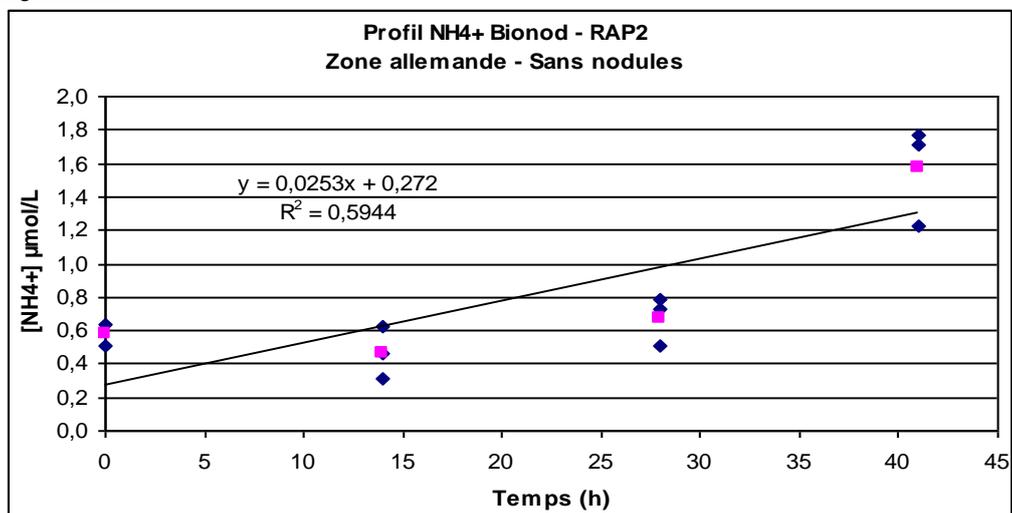
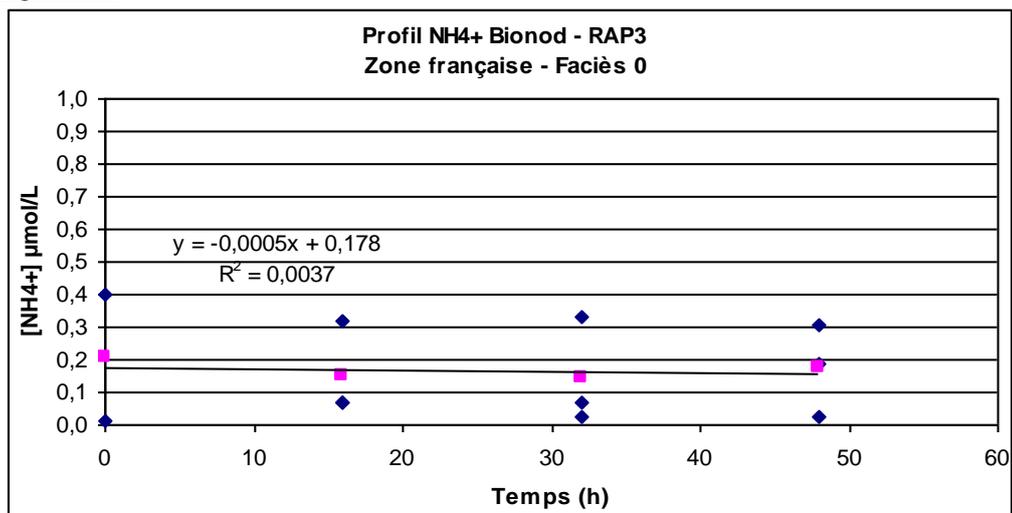


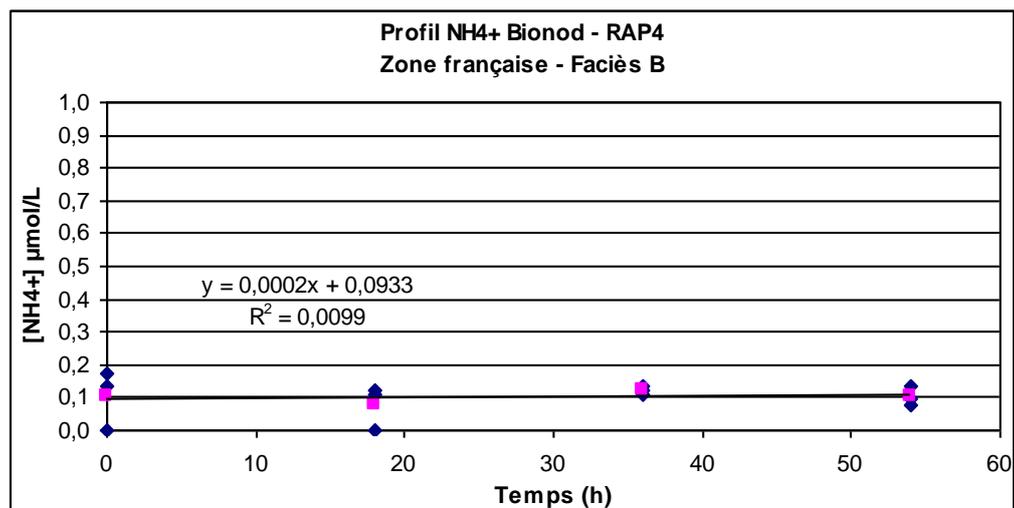
Bionod - RAP 4 - Zone Française - Faciès B

4.2. Annexe n° 2 : Résultats de l'ammonium de Bionod

	Echantillons	incubation heures	NH4+ $\mu\text{mol/L}$	Résultats $\mu\text{mol/L}$	Incub heures	Moyenne μM	Ecart type
Zone 1 Allemande Nodules RAP1	RAP1 - EXT1	0	0,31	<1 $\mu\text{mol/L}$	0	0,2	0,11
	RAP1 - EXT2	0	0,15	<1 $\mu\text{mol/L}$	15	0,2	0,20
	RAP1 - C1	15	0,00	<1 $\mu\text{mol/L}$	29	0,6	0,28
	RAP1 - C2	29	0,57	<1 $\mu\text{mol/L}$	43	0,7	0,16
	RAP1 - C3	43	0,87	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP1 - C4	15	0,23	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP1 - C5	29	0,89	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP1 - C6	43	0,68	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP1 - C7	15	0,40	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP1 - C8	29	0,33	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP1 - C9	43	0,55	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	Zone 1 Allemande Sans nodule RAP2	RAP2 - EXT1	0	0,51	<1 $\mu\text{mol/L}$	0	0,6
RAP2 - EXT2		0	0,64	<1 $\mu\text{mol/L}$	14	0,5	0,16
RAP2 - C1		14	0,63	<1 $\mu\text{mol/L}$	28	0,7	0,15
RAP2 - C2		28	0,73	<1 $\mu\text{mol/L}$	41	1,6	0,30
RAP2 - C3		41	1,77	1,8			
RAP2 - C4		14	0,47	<1 $\mu\text{mol/L}$			
RAP2 - C5		28	0,79	<1 $\mu\text{mol/L}$			
RAP2 - C6		41	1,23	1,2			
RAP2 - C7		14	0,31	<1 $\mu\text{mol/L}$			
RAP2 - C8		28	0,51	<1 $\mu\text{mol/L}$			
RAP2 - C9		41	1,71	1,7			
Zone 2 Française Faciès 0 RAP3		RAP3 - EXT	0	0,01	<1 $\mu\text{mol/L}$	0	0,2
	RAP3 - C1	16	0,32	<1 $\mu\text{mol/L}$	16	0,2	0,15
	RAP3 - C2	32	0,07	<1 $\mu\text{mol/L}$	32	0,1	0,17
	RAP3 - C3	48	0,31	<1 $\mu\text{mol/L}$	48	0,2	0,14
	RAP3 - C4	16	0,07	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP3 - C5	32	0,03	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP3 - C6	48	0,03	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP3 - C7	16	0,07	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP3 - C8	32	0,33	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP3 - C9	48	0,19	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP3 - C10	0	0,40	<1 $\mu\text{mol/L}$			
Zone 2 Française Faciès B RAP4	RAP4 - EXT1	0	0,17	<1 $\mu\text{mol/L}$	0	0,1	0,09
	RAP4 - EXT2	0	0,13	<1 $\mu\text{mol/L}$	18	0,1	0,07
	RAP4 - C1	18	0,12	<1 $\mu\text{mol/L}$	36	0,1	0,01
	RAP4 - C2	36	0,11	<1 $\mu\text{mol/L}$	54	0,1	0,03
	RAP4 - C3	54	0,09	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C4	18	0,00	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C5	36	0,13	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C6	54	0,08	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C7	18	0,11	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C8	36	0,12	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C9	54	0,13	<1 $\mu\text{mol/L}$			
	RAP4 - C10	0	0,00	<1 $\mu\text{mol/L}$			

Tableau n° 1 : Résultats ammonium Bionod

Figure n° 2 : Profil NH₄⁺ Bionod – RAP 1 Zone Allemande – NodulesFigure n° 3 : Profil NH₄⁺ Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Sans nodulesFigure n° 4 : Profil NH₄⁺ Bionod – RAP 1 Zone Française – Faciès 0

Figure n° 5 : Profil NH₄⁺ Bionod – RAP 1 Zone Française – Faciès B

4.3. Annexe n° 3 : Résultats du DIC de Bionod

		T °C	Salinité	Densité
Zone 1 Allemande	RAP 1	1,49	34,69	1,0278
	RAP 2	1,49	34,69	1,0278
Zone 2 Française	RAP 3	1,49	34,69	1,0278
	RAP 4	1,49	34,69	1,0278

Tableau n° 2 : Calcul de densité Bionod

		incubation (h)	[CO ₂] µmol/Kg	[CO ₂] µmol/L	Incub (h)	Moy µM	Ecart type
Zone 1 Allemande Nodules Ch 1 avec nodule RAP1	RAP1 - EXT1	0	2222	2162	0	2159	3
	RAP1 - EXT2	0	2216	2157	15	2189	15
	RAP1 - C2	29	2239	2178	29	2196	15
	RAP1 - C3	43	2311	2248	43	2227	19
	RAP1 - C4	15	2261	2200	Moy Ch 1,2 et 3		
	RAP1 - C5	29	2268	2207	0	2159	3
	RAP1 - C6	43	2274	2213	15	2189	15
	RAP1 - C7	15	2238	2178	29	2204	3
	RAP1 - C8	29	2264	2202	43	2216	4
	RAP1 - C9	43	2281	2219	Moy Ch 2 et 3		
Zone 1 Allemande Sans nodule RAP2	RAP2 - EXT1	0	2240	2179	0	2175	6
	RAP2 - EXT2	0	2232	2171	14	2184	6
	RAP2 - C1	14	2246	2185	28	2195	6
	RAP2 - C2	28	2259	2198	41	2219	10
	RAP2 - C3	41	2288	2226			
	RAP2 - C4	14	2250	2189			
	RAP2 - C5	28	2260	2199			
	RAP2 - C6	41	2273	2211			
	RAP2 - C7	14	2238	2178			
	RAP2 - C8	28	2248	2188			
RAP2 - C9	41	2238	2177				

Zone 2 Française Faciès 0 RAP3	RAP3 - EXT	0	2187	2128	0	2161	/
	RAP3 - C1	16	2257	2196	16	2199	4
	RAP3 - C2	32	2269	2208	32	2195	12
	RAP3 - C3	48	2258	2197	48	2199	9
	RAP3 - C4	16	2265	2204			
	RAP3 - C5	32	2252	2191			
	RAP3 - C6	48	2269	2208			
	RAP3 - C7	16	2260	2199			
	RAP3 - C8	32	2247	2186			
	RAP3 - C9	48	2252	2191			
	RAP3 - C10	0	2221	2161			
Zone 2 Française Faciès B RAP4	RAP4 - EXT1	0	2224	2163	0	2165	2
	RAP4 - EXT2	0	2226	2166	18	2167	2
	RAP4 - C1	18	2229	2169	36	2184	7
	RAP4 - C2	36	2247	2186	54	2204	4
	RAP4 - C3	54	2260	2199			
	RAP4 - C4	18	2227	2167			
	RAP4 - C5	36	2249	2188			
	RAP4 - C6	54	2267	2206			
	RAP4 - C7	18	2224	2164			
	RAP4 - C8	36	2237	2176			
	RAP4 - C9	54	2268	2206			

Tableau n° 3 : Résultats CO2 Bionod

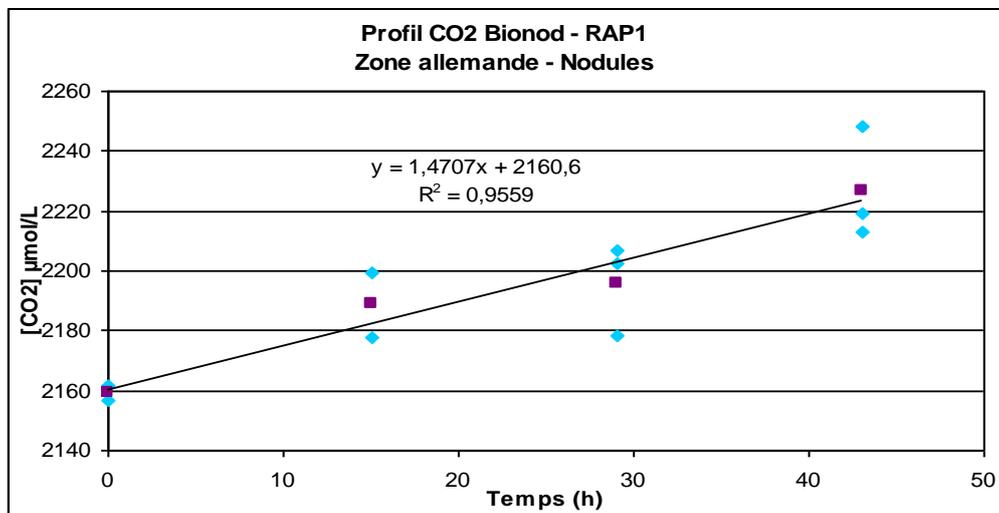


Figure n° 6 : Profil CO2 Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Nodules

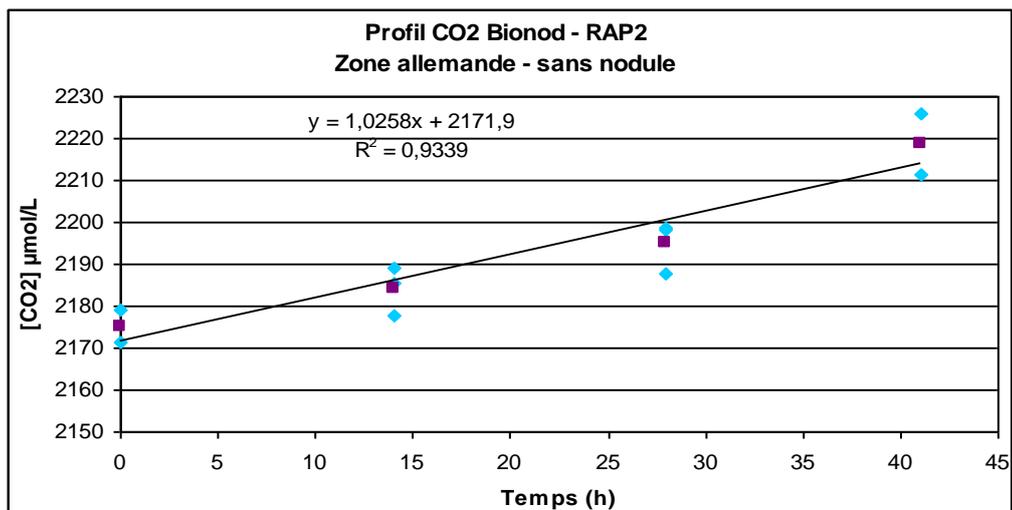


Figure n° 7 : Profil CO2 Bionod – RAP 1 Zone Allemande – Sans nodules

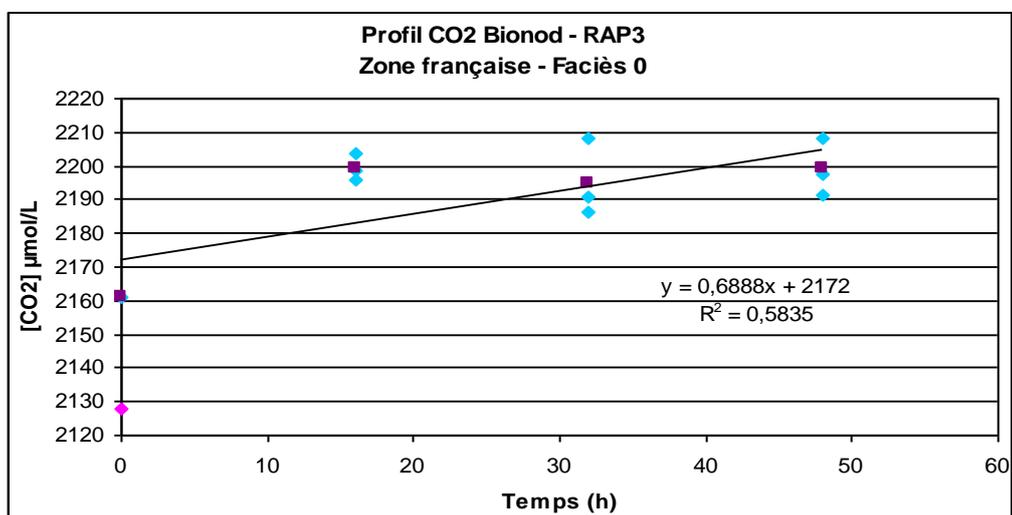


Figure n° 8 : Profil CO2 Bionod – RAP 3 Zone Française – Faciès 0

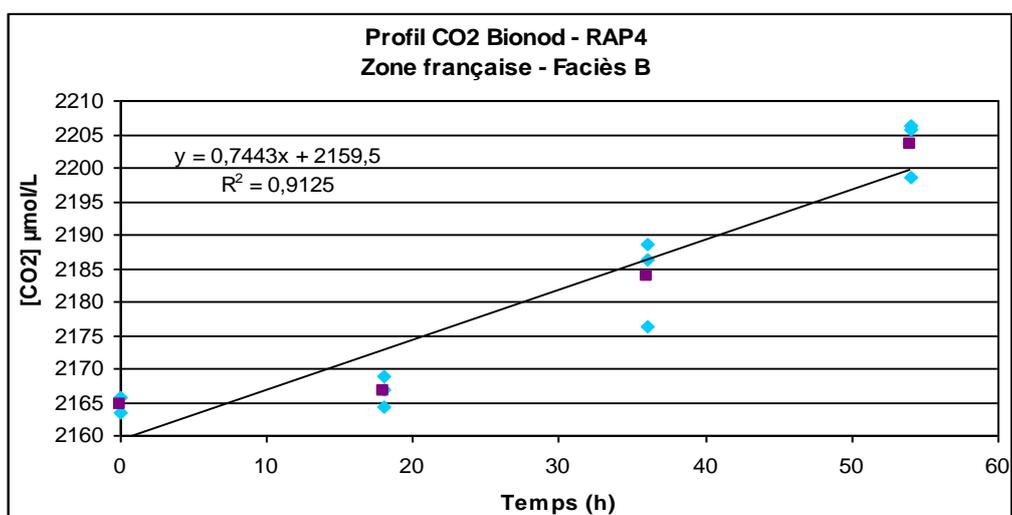


Figure n° 9 : Profil CO2 Bionod – RAP 4 Zone Française – Faciès B

5. Bibliographie

Aminot, A., K erouel, R., Birot D., May 2001. A flow injection-fluorometric method for the determination of ammonium in fresh and saline waters with a view to in situ analyses. *Water Research* 35, p 1777-1785.

Essirard M., Caprais J.C., 2011. *Caract risation chimique et mesure de flux sur deux environnements chimiosynth tiques profonds : Golfe de Californie et Golfe de Golfe de Guin e*. Rapport REM-EEP-LEP 11-19, Ifremer. 21 p.

Holmes, R.M., Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, B.A., Peterson, B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56 (10), p 1801-1808.

Kaltin, S., Haraldsson, C., Anderson, L.G., 2005. *A rapid method for determination of total dissolved inorganic carbon in seawater with high accuracy and precision*. *Marine Chemistry* 96 (1-2), 53 p.

K erouel, R., Aminot, A., 1997. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Marine Chemistry* 57, p 265-275.

Schulz, H.D.; Zabel, M.; 2000. *Marine Geochemistry*, Springer.

<http://www.reef-guardian.com/modules.php?name=calcul&op=densite>

[Dickson andrew.ucsd.edu/co2qc/index.html](http://Dickson.andrew.ucsd.edu/co2qc/index.html)