

UTILISATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE
D'ÉMISSION POUR LA DÉTERMINATION DE ^{15}N EN ÉCOLOGIE
AQUATIQUE: ASSIMILATION DU NITRATE PAR LE PHYTOPLANCTON
EN MER DE BANDA (INDONÉSIE)

LIONEL LEMASSON

Centre ORSTOM, B.P. A5, Noumea, Nouvelle-Calédonie

et

JEAN PAGES

CRODT, B.P. 2241, Dakar, Sénégal

Résumé: Une méthode d'analyse de ^{15}N dans le phytoplancton par spectrométrie optique d'émission est décrite. La faible quantité d'échantillon marqué nécessaire (minimum de $2\ \mu\text{g}$) permet de réduire le volume des flacons à incubation, avantage appréciable pour les incubations effectuées sur un navire. Les échantillons sont traités par micro-Dumas dans des ampoules à décharge scellées en verre borosilicaté. Les produits secondaires de combustion sont piégés par l'azote liquide. La méthode a été essayée avec succès dans la Mer de Banda (croisière Corindon 4, du N.O. Coriolis en Indonésie) sur du phytoplancton marqué par ^{14}C et ^{15}N . Les productions mesurées indiquent que les eaux côtières sont de type mésotrophe; les taux d'assimilation spécifiques pour l'azote varient pour les eaux de surface, de $0,00005\ \text{h}^{-1}$ à $0,0230\ \text{h}^{-1}$ et pour le carbone de $0,0019\ \text{h}^{-1}$ à $0,0295\ \text{h}^{-1}$.

Abstract: A routine procedure for ^{15}N determination with an optical emission spectrometer is described. The required amount of labelled sample (minimum $2\ \mu\text{g}$) is small and so it is possible to reduce the volume of the incubation-flasks (1 liter or less), which is advantageous when working on board ship. Samples are processed by the micro-Dumas method in sealed borosilicated discharge tubes. Combustion by products are trapped in liquid nitrogen. The method has been used successfully in the Banda Sea (cruise Corindon 4, N.O. Coriolis, in Indonesia) with labelled phytoplankton (^{14}C and ^{15}N). In surface waters specific uptake rates for N are in the range of $0.00005\ \text{h}^{-1}$ to $0.0230\ \text{h}^{-1}$ and of $0.0019\ \text{h}^{-1}$ to $0.0295\ \text{h}^{-1}$ for C.

INTRODUCTION

L'étude du cycle de l'azote en écologie aquatique s'est longtemps heurtée à l'obstacle de l'analyse en routine de cet élément qui nécessite, lorsque l'on utilise l'isotope stable ^{15}N comme traceur, l'emploi d'un spectrographe de masse, appareil de coût élevé et délicat d'utilisation. Par contre la spectrométrie d'émission a été utilisée par plusieurs auteurs qui l'ont appliquée surtout sur des marquages faits sur des éléments végétaux supérieurs où la quantité de matière à analyser n'était pas limitée. Une revue de ces essais a été faite par Fieldler & Proksch (1975) et plus récemment par Middelboe (1980).

En écologie aquatique certaines difficultés se présentent: faibles quantités de matériel marqué, nombreux échantillons et multiplicité des incubations, travail en mer dans des conditions souvent difficiles, tous facteurs contribuant à freiner le développement de

l'emploi de ^{15}N comme traceur. Il nous a semblé utile de pouvoir disposer d'une méthode de routine permettant de faire une étude des flux des éléments nutritifs azotés, en adaptant la méthode d'analyse par spectrométrie optique d'émission aux besoins de l'écologie aquatique.

Dans tous les cas, partant d'un produit solide, il faut obtenir un mélange gazeux de molécules d'azote qui sera analysé. Deux procédés sont utilisés pour transformer l'azote organique en azote gazeux: la minéralisation peut se faire soit par le procédé de Kjeldahl où les composés azotés sont transformés sous forme ammoniacale et oxydés ensuite par la méthode de Rittenberg, soit par la méthode de Dumas; dans ce dernier cas les composés organiques sont oxydés par CuO et réduits ensuite en azote gazeux par le cuivre en présence d'un catalyseur. C'est cette dernière méthode qui a été retenue, en la miniaturisant (Lemasson *et al.*, 1982) et qui a été utilisée pour l'étude de l'assimilation du nitrate parallèlement à des études de production primaire photosynthétique (avril 1982), au cours d'une croisière du "N.O. Coriolis" (Corindon 4) en Mer de Banda (Maluku, Indonésie), croisière effectuée en collaboration avec le National Institute of Oceanology d'Indonésie.

Des mesures simultanées des taux d'assimilation du carbone et de l'azote à l'aide des isotopes ^{14}C et ^{15}N ont été effectuées au cours d'incubations *in situ*. La cinétique d'assimilation du nitrate en fonction de la concentration en $\text{NO}_3\text{-N}$ a été étudiée au cours d'incubations *in situ* simulé.

Une série de stations ont été faites dans la baie d'Ambon, baie étroite et allongée (25 km) où un seuil peu profond (16 m) sépare une baie intérieure (Stations 2 et 32), de profondeur voisine de 45 m, de la partie extérieure (Stations 10 et 31) dont la profondeur atteint 400 m à l'entrée de la baie. Une autre série de stations (Stations 20, 23 et 30) ont été effectuées au large dans la Mer de Banda entre les îles d'Ambon et de Buru.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRODUCTION PHOTOSYNTHÉTIQUE

Les estimations ont été effectuées par la méthode standard utilisant le ^{14}C (Steemann Nielsen, 1952) sous forme de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$. Les incubations étaient faites dans des flacons en verre borosilicaté de 280 ml, et inoculés avec 200 ou 400 μl de solution de marquage, donnant une activité spécifique de $2,64 \times 10^5$ à $5,38 \times 10^5 \text{ Bq} \cdot \text{l}^{-1}$.

Deux sortes d'expérimentation ont été faites, toutes deux avec une eau de mer filtrée préalablement sur tamis de 125 μm de maille pour éliminer les prédateurs les plus grands.

Incubations in situ simulé

Les flacons sont enveloppés dans des écrans neutres permettant de simuler les intensités lumineuses désirées (100, 50, 25, 10, 5, 3 et 1% de la lumière incidente). La

correspondance avec la profondeur est faite par comparaison avec la profondeur d'observation du disque de Secchi. Les incubations sont faites avec de l'eau de surface et les flacons mis à incuber dans des bacs où une circulation d'eau de surface maintenait la température constante et voisine de 29 °C (± 1 °C) pour l'ensemble des stations. Les durées d'incubation variaient entre 4 et 10 h.

Incubations in situ

Les prélèvements, effectués à l'aide de bouteilles en PVC (Niskin) à des profondeurs déterminées par le disque de Secchi et correspondant aux pénétrations lumineuses de 100, 50, 25, 10, 5 et 1% de la lumière incidente en surface, sont, après inoculation de [^{14}C]carbonate, mis à incuber aux profondeurs de prélèvement. Les durées d'incubation variaient de 4 à 10 h. Les températures d'incubation, voisines de 29 °C en surface, étaient proches de 24 °C pour les immersions les plus profondes correspondant au 1% de lumière incidente.

Dans les deux cas, les éléments nutritifs sont analysés immédiatement après le prélèvement selon les méthodes classiques (Strickland & Parsons, 1972) et la chlorophylle mesurée par fluorimétrie *in vivo*.

L'analyse du seston se fait sur eau de mer pré-tamisée sur soie de 125 μm de vide de maille, et filtrée sur filtre d'argent de 0,8 μm de porosité (Selas Flotronics); les filtres, conservés (après séchage à 60 °C) à -20 °C, sont analysés au laboratoire à terre pour la détermination du C et du N particulaires (CHN Hewlett-Packard 185 B).

Après filtration sur filtres de fibre de verre Whatman GF/C, les filtres sont rincés avec HCl N/100 et conservés, après séchage, au congélateur à -20 °C. Les comptages ont été effectués à terre en scintillation liquide avec un compteur Intertechnique. Pour les eaux saumâtres de la baie d'Ambon (Maluku) les concentrations de CO_2 total ont été estimées au moyen de la relation établie pour les eaux saumâtres par Lemasson & Pages (1980). Les taux d'absorption (ρ_C) pour le carbone sont exprimés en $\mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$ et les taux d'absorption spécifique (V_C) en h^{-1} (en fait en $\mu\text{M C} (\mu\text{M C}_p)^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Pour le nitrate, de façon analogue, les résultats sont exprimés en $\mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$ (ρ_N) et h^{-1} (V_N).

ABSORPTION DU NITRATE

L'absorption du nitrate a été évaluée au moyen de l'isotope stable ^{15}N de deux façons.

Incubations in situ

Les échantillons d'eau préfiltrée sur 125 μm sont enrichis d'environ 10% (par rapport à la concentration du milieu), par du nitrate marqué ($^{15}\text{NO}_3$) $_2\text{Ca}$ à 99%. Les flacons, d'un volume de 2580 ml, sont mis à incuber pendant 12 h aux profondeurs correspondant au niveau de 100, 50, 25, 10, 5 et 1% de la lumière incidente reçue en surface.

Incubations in situ simulé – cinétique d'assimilation du nitrate en fonction de la concentration en nitrate dans le milieu

Lorsque l'on se trouve à des concentrations ambiantes de nitrate proches du seuil de détection, une addition d'élément nutritif marqué peut accroître de 50 à 100% ou plus la quantité de cet élément, faussant de ce fait l'estimation des taux d'assimilation. Il est heureusement possible d'extrapoler en utilisant les paramètres de la cinétique d'assimilation que l'on déterminera par des expériences appropriées, pour les concentrations réelles en élément nutritif (MacIsaac & Dugdale, 1972).

En utilisant l'expression de Michaelis–Menten:

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{K_t + S},$$

où S représente la concentration du milieu en nitrate, V représente le taux d'absorption et si on connaît V_{\max} (vitesse maximale d'absorption) et K_t (concentration du substrat pour laquelle $V = (V_{\max}/2)$, appelée "constante de transport") il est théoriquement possible de calculer V . Ici, V s'exprimera en unités de $\text{NO}_3\text{-N}$ absorbé par unité de temps et par unité de N_p (azote particulaire), c'est-à-dire en t^{-1} .

Les échantillons à incuber sont enrichis avec 0,2; 0,5; 1; 5; et $10 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{KNO}_3\text{-}^{15}\text{N}$, et les incubations réalisées à 100% de lumière incidente dans un incubateur refroidi par de l'eau de mer courante. La durée des incubations était de 6 h. Après filtration sur filtre de fibre de verre de 25 mm Whatman GF/C les filtres, séchés à 60°C , sont conservés à -20°C et analysés au laboratoire à terre. Dans tous les cas la dépression de filtration ne dépassait pas 100 mm Hg. Les constantes cinétiques ont été calculées par la méthode de Sakoda & Hiromi (1976).

TECHNIQUE DE LA MESURE PAR SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION DES TENEURS EN ^{15}N

Analyse du phytoplancton marqué par ^{15}N

La méthode utilisée a été décrite en détail par Lemasson *et al.* (1982). Cependant certaines modifications ont été faites pour les études du milieu aquatique. La quantité d'azote du phytoplancton retenu sur le filtre doit être comprise entre 10 et $50 \mu\text{g}$, limites imposées pour des raisons qui seront exposées par la suite. On déterminera au préalable soit de façon très approximative cette quantité à partir des concentrations en chlorophylle du milieu et en utilisant un rapport de conversion $C_p/\text{Chl } a$ estimé d'après le type de milieu, soit après avoir fait les analyses de seston à l'analyseur CHN. Cette estimation étant en général faite a posteriori, on pourra n'utiliser qu'une partie du filtre; on répand sur celui-ci environ 20 mg de Cuprox (Coleman) finement broyé. Le filtre est ensuite replié et roulé, et introduit au fond d'un tube de verre borosilicaté scellé à un bout. Ce tube est ensuite connecté à une rampe à vide par l'intermédiaire d'un tuyau de caoutchouc. Un vide d'au moins 10^{-3} torr est réalisé; les parois internes du tube sont

dégazées à 550 °C sous vide actif pendant 10 min dans un micro-four électrique. Le tube est ensuite scellé au chalumeau, donnant une ampoule d'environ 20 cm de long, puis mis au four électrique pour la combustion de l'échantillon à 550 °C pendant 1 h.

Analyse de la teneur en ^{15}N

L'appareil utilisé est un spectromètre d'émission GS 1 (SOPRA, France) dont le principe a été décrit par Guiraud & Fardeau (1980). Après refroidissement le tube scellé est placé verticalement entre deux électrodes d'excitation entre lesquelles passent un champ de haute fréquence (30 GHz); l'extrémité inférieure du tube est plongée dans l'azote liquide permettant le piégeage des gaz de combustion (principalement le gaz carbonique et l'eau) sauf l'azote moléculaire produit par la réduction des oxydes d'azote. Le spectre de l'émission lumineuse analysée par un réseau optique est enregistré graphiquement, et correspond aux longueurs d'onde des trois molécules d'azote possibles, soit 297,7 nm pour $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$, 298,3 nm pour $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ et 298,9 nm pour $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$.

Pour chaque type de molécule on mesure la hauteur du pic d'émission correspondant qui est proportionnelle à la concentration de celle-ci dans le mélange gazeux. Si on pose:

$$R = \frac{H_{29}}{H_{28}} \quad \text{et} \quad R' = \frac{H_{30}}{H_{29}},$$

$H_{n+n'}$ étant la hauteur du pic $^{n}\text{N}^{n'}$ N; la teneur T en pourcentage d'atomes ^{15}N est calculée par une des deux équations suivantes:

$$T = \frac{100 \times R}{(2 + R)} \quad T' = \frac{200 \times R'}{(2R' + 1)}$$

Les excès (% d'atomes ^{15}N en excès) sont calculés en soustrayant de T la valeur de ^{15}N naturelle.

Nous avons évoqué dans le paragraphe précédent la nécessité de connaître la quantité approximative de matière introduite dans l'ampoule (en termes d'azote); en effet si la quantité d'azote est insuffisante la pression des gaz, après combustion, sera insuffisante dans l'ampoule pour permettre une émission lumineuse; et si cette quantité est trop forte (supérieure à 50 μg) la pression des gaz, même après refroidissement prolongé du tube dans l'azote liquide, sera trop importante pour permettre une décharge électrique entre les deux électrodes.

La méthode a été appliquée au laboratoire sur des cultures de phytoplancton (*Phaeodactylum tricoratum*) dans des milieux enrichis en $^{15}\text{NO}_3\text{-N}$ ou en $^{15}\text{NH}_4\text{N}$ ($E = 99,1\%$) et a montré pour $\text{NH}_4\text{-N}$ un très bon agrément entre les résultats obtenus au spectromètre d'émission et au spectrographe de masse. Par contre, pour $\text{NO}_3\text{-N}$ les résultats obtenus par spectrométrie d'émission sont un peu plus élevés. Une explication possible est que la méthode de Kjeldahl effectuée avant l'analyse au spectrographe de

masse ne reminéralise pas entièrement le "pool" intra-cellulaire de $\text{NO}_3\text{-N}$ fortement marqué. Les résultats sont très reproductibles; une analyse de la variabilité a montré que le coefficient de variation (C_v) entre deux répliques varie entre 0,9 et 1,6%: pour 30 séries de 2 répliques on a un C_v de 0,9%, pour 10 séries de 3 répliques il est de 1,6%, pour 7 répliques le C_v est de 0,7%, ceci pour une teneur de 0,694% ^{15}N .

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont résumés dans les Tableaux I, II et III. Quatre stations (Stations 2, 10, 31 et 32) ont été effectuées dans la baie d'Ambon dans laquelle se jettent les effluents de la ville d'Ambon mais peu polluée par suite d'un renouvellement efficace des eaux par la marée et une onde interne de forte amplitude dont le ventre d'oscillation se situe à l'embouchure de la baie (Rébert, comm. pers.; Corindon 4, sous presse). Les trois autres stations en eau profonde (Stations 20, 23 et 30) ont été faites au large dans des eaux de type oligotrophe.

CINÉTIQUE D'ABSORPTION DE L'AZOTE SOUS FORME DE NITRATE (Tableau I)

La production primaire azotée est contrôlée par deux facteurs essentiels: la lumière et la concentration en éléments minéraux azotés. On sait qu'une population naturelle est caractérisée, par analogie à la cinétique de Michaelis-Menten, par sa vitesse d'absorption spécifique (V_{\max} , en h^{-1}) et sa constante de demi-saturation K_t . Ces constantes ont été déterminées d'une part dans les eaux du large, d'autre part dans les eaux de la baie. Les deux stations de l'intérieur de la baie (Stations 2 et 10) relativement riches par rapport aux stations du large présentent toutes deux des K_t assez élevés (Tableau I), alors que ceux-ci sont très faibles aux stations du large (Stations 20 et 23); en clair cela signifie que les populations du large sont bien adaptées au caractère oligotrophe de ces eaux très pauvres en azote nitrique (concentrations en nitrate à l'état de traces).

TABLEAU I

Constantes cinétiques des eaux de surface (V_{\max} et K_t) et taux d'assimilation spécifiques (V_{NO_3}): N_p , azote particulaire; $\text{NO}_3\text{-N}$, concentration dans le milieu.

No. Station	V_{\max} (h^{-1})	K_t ($\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$)	V_{NO_3} (h^{-1})	N_p ($\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$)	$\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$)	ρNO_3 ($\mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$)
2	0.0014*	0.408*	0.0004*	1.75	0.15	0.00023
10	0.0408	0.248	0.0230	1.16	0.32	0.0267
20	0.0051	0.954	0.0000 (5)	0.605	(0.01)**	0.00003
23	0.0041	0.370	0.0001 (1)	0.634	(0.01)**	0.00007

* Valeurs douteuses.

** Traces; cette valeur est estimée et a été utilisée dans les calculs.

La Station 10 se situe dans la zone qui reçoit les eaux usées d'Ambon, et les valeurs relativement élevées s'expliquent par une certaine eutrophisation. Par contre les eaux du fond de la baie, renouvelées par le phénomène d'onde interne restent assez pauvres ce qui est souligné par les autres paramètres (biomasse, éléments nutritifs, profondeur du disque de Secchi). Les valeurs obtenues au large sont de l'ordre de grandeur de celles obtenues par Eppley *et al.* (1977) et par MacIsaac & Dugdale (1969), correspondant à des eaux oligotrophes tropicales. Cependant les résultats obtenus ne peuvent qu'être indicatifs car les concentrations en nitrate étant voisines de zéro la cinétique d'absorption ne suit la loi de Michaelis-Menten que si la concentration du milieu est nettement supérieure à K_i (Williams, 1973), ce qui n'est le cas pour aucune des stations, et en particulier pour les deux stations du large. Les taux d'absorption mesurés seraient en fait beaucoup plus élevés que ceux qui ont été calculés.

PRODUCTION PRIMAIRE PHOTOSYNTHÉTIQUE ET ABSORPTION DU NITRATE (Tableaux 2 et 3)

Les valeurs intégrées de la production primaire sont caractéristiques, dans la baie d'Ambon externe où se déversent les effluents de la ville d'Ambon, d'eaux productives (Stations 10, 31 et 32: production de 49,2 à 85,8 $\text{mg C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$). Cette production est plus faible dans la baie intérieure (30,4 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ à la Station 2) et aux stations du large (10,8 à 26,1 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivement aux Stations 30 et 23). Les taux d'assimilation spécifique pour C varient de $0,0019 \cdot \text{h}^{-1}$ (Station 30 du large) à $0,0295 \cdot \text{h}^{-1}$ (Station 32 en baie d'Ambon).

Les rapports d'assimilation sont élevés et supérieurs aux rapports C_p/N_p du seston: $\Delta C/\Delta N$ varie de 36,3 à 68,7 pour l'ensemble de la couche euphotique, alors que les rapports C_p/N_p varient de 4,8 à 9,9; ceci semblerait indiquer que le $\text{NO}_3\text{-N}$ ne

TABLEAU II

Valeurs intégrées de la production primaire photosynthétique (Prod.) sur toute la colonne d'eau entre 100 et 1% de lumière incidente et taux d'assimilation spécifique (V_c) dans la couche de surface: Stations 2, 10, 20, 23, in situ simulé; C_p , carbone particulaire, valeurs extrêmes sur la colonne d'eau entre 1 et 100% de lumière.

No. Station	Prod. ($\text{mg C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	C_p/N_p	100% lumière		C_p ($\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1}$)
			β_c ($\mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	V_c (h^{-1})	
2	30,4	11,4	0,242	0,0121	19,97
10	85,8	13,6	0,291	0,0184	15,78
20	25,9	16,5	0,054	0,0086	5,71
23	26,1	10,0	0,092	0,0144	6,37
30	10,8	7,7-8,3	0,012	0,0019	5,4-15,5
31	62,1	7,5-9,9	0,167	0,0136	7,7-16,3
32	49,2	4,8-8,2	0,624	0,0295	13,3-21,1

représente qu'une faible part de la nutrition azotée, ce qui est en accord avec le fait que dans ces eaux c'est la production régénérée qui est la part la plus importante de la production totale. L'ammoniaque, absorbé préférentiellement par rapport au nitrate

TABLEAU III

Assimilation du nitrate et rapports d'assimilation ($\Delta\rho_C/\Delta\rho_N$) C photosynthétique/nitrate: $\Delta C/\Delta N$, rapport d'assimilation moyen pour la colonne d'eau.

No. Station	Profondeur, Z, (m)	f m%	N _p	ρ_{NO_3} ($\mu M \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	V_{NO_3} (h^{-1})	C_p/N_p	$\Delta C/\Delta N$ (at : at)
30	0	100	0,81	0,00048	0,00059	7,7	36,3
	15	50	1,96	0,00013	0,00007	7,9	
	26	25	0,05	0,00002	0,00003	8,3	
31	0	100	1,63	0,00332	0,00204	7,2	58,2
	16	25	0,91	0,00214	0,00234	9,9	
	27	10	1,34	0,00116	0,00086	7,5	
	40	5	1,30	0,00022	0,00017	8,1	
32	0	100	2,21	0,00783	0,00354	8,2	68,7
	5	50	1,85	0,00249	0,00135	5,3	
	10	25	2,36	0,00127	0,00054	4,8	
	17	10	1,93	0,0051	0,00026	6,2	
	25	5	1,55	0	0	7,2	

doit être en relative abondance dans les eaux de la baie où les eaux usées urbaines sont rejetées. Les données de production et de concentrations en éléments nutritifs indiquent que la baie d'Ambon et les eaux côtières de la mer de Banda sont du type mésotrophe, l'azote en étant l'élément limitant.

AVANTAGES DE LA MÉTHODE D'ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION PAR RAPPORT À LA MÉTHODE UTILISANT LE SPECTROGRAPHE DE MASSE

(1) Un premier avantage est celui de pouvoir travailler avec de faibles quantités de phytoplancton, donc de pouvoir utiliser des volumes d'incubation petits (1 litre ou moins suivant la richesse en seston des eaux), aspect pratique non négligeable lorsque l'on sait les difficultés de manipulation de gros flacons en mer. En utilisant des tubes de diamètre intérieur plus faible il est possible de réduire la quantité minimum de matière nécessaire; des essais ont été positifs avec $2 \mu g N$. D'autre part en soutenant l'émission avec un gaz inerte (Krypton) on peut encore abaisser cette limite (Lemasson *et al.*, 1982).

(2) La réaction d'oxydation et de réduction de la matière organique se faisant à l'intérieur du tube, tout risque de pollution est ainsi évité.

(3) Les tubes peuvent être directement préparés à bord du navire si l'on dispose d'un

vide suffisant (pompe à vide Alcatel à deux étages), la combustion et l'analyse se faisant à terre.

(4) Une mesure peut être répétée un nombre indéfini de fois, puisque l'ampoule reste intacte après la mesure.

(5) Il est maintenant possible de faire des triples marquages sur le même échantillon à incuber avec deux traceurs radioactifs de rayonnements énergétiques différents tels que ^{14}C et ^{32}P simultanément avec l'isotope stable ^{15}N sans risquer une pollution par éléments radioactifs de l'appareil de mesure dans le cas du spectrographe de masse. Cet aspect est sans doute un des plus intéressants puisqu'il permettra l'étude simultanée de l'assimilation des trois éléments principaux de la matière vivante sur le même échantillon par des triples marquages en supprimant l'incertitude provenant d'incubations différentes.

(6) Le piégeage des gaz se fait classiquement par le CaO (Fiedler & Proksch, 1975); les essais ont montré qu'en fait le piégeage était imparfait, le dégazage de CaO n'étant jamais complet; les risques de pollution sont d'autre part accrus. La condensation des gaz en plongeant l'ampoule dans N_2 liquide améliore considérablement le spectre d'émission. Cette méthode a en outre l'avantage de simplifier grandement les manipulations.

La précision est satisfaisante dans la gamme d'abondance étudiée (0 à 30% ^{15}N). On peut admettre, puisque la variabilité des lectures est du même ordre de grandeur pour toute la gamme des teneurs, que la source principale d'erreur provient de la lecture du spectre. Le problème principal réside dans la définition de la ligne de base de l'enregistrement, délicate et entachée d'erreur lorsque l'on utilise le CaO pour le piégeage, mais considérablement améliorée lorsque l'on utilise l'azote liquide, surtout pour les échantillons à faible teneur.

Enfin les faibles quantités d'azote particulière nécessaires pour l'analyse, en réduisant le volume des flacons à incubation, permettent d'accroître le nombre des répliques. L'application faite en mer de Banda, bien que peu importante, a confirmé la simplicité d'utilisation de la méthode pour les études de production primaire.

REMERCIEMENTS

Nous sommes très reconnaissants à MM. Boucher et Samain du Centre Océanologique de Bretagne (Brest) d'avoir bien voulu nous permettre d'utiliser leur analyseur CHN, ainsi qu'à MM. Guiraud et Fardeau du Centre d'Études Nucléaires (Cadarache) pour l'utilisation de leurs appareils d'analyse pour les déterminations de ^{14}C et de ^{15}N .

RÉFÉRENCES

- "CORINDON IV", sous presse. A French Indonesian Expedition - April 1981. Scientific results (Hydrology, Dynamics, Productivity, Plankton). *Rap. Scient. Tech. ORSTOM-Nouméa*.
- EPPLEY, R. W., J. H. SHARP, E. H. RENGER, M. J. PERRY & W. G. HARRISON, 1977. Nitrogen assimilation by phytoplankton and other microorganisms in the surface waters of the central north Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, Vol. 39, pp. 111-120.
- FIEDLER, R. & G. PROKSCH, 1975. The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis: a review. *Anal. Chim. Acta*, Vol. 78, pp. 1-62.
- GUIRAUD, G. & J. C. FARDEAU, 1980. Détermination isotopique par spectrométrie optique de composés faiblement enrichis en azote 15. *Analisis*, Vol. 8, pp. 148-152.
- LEMASSON, L. & J. PAGES, 1980. Méthodes simples de détermination du CO₂ total et du carbone organique dissous en eau saumâtre. *Arch. Sci. CRO Abidjan*, Vol. 6(4), pp. 27-36.
- LEMASSON, L., J. PAGES & G. GUIRAUD, 1982. Routine ¹⁵N analysis on small samples by emission spectrometry. *Analisis*, Vol. 10, pp. 23-30.
- MACISAAC, J. J. & R. C. DUGDALE, 1969. The kinetics of nitrate and ammonia uptake by natural populations of marine phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, Vol. 16, pp. 45-57.
- MACISAAC, J. J. & R. C. DUGDALE, 1972. Interactions of light and inorganic nitrogen in controlling nitrogen uptake in the sea. *Deep-Sea Res.*, Vol. 19, pp. 209-232.
- MIDDELBOE, V., 1980. On analysis and use of nitrogen-15. A survey of selected papers. *K. Vet. Landbohøjsk., Arsskr.*, pp. 1-22.
- SAKODA, M. & K. HIROMI, 1976. Determination of the best fit values of kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation by the method of least squares with the Taylor expansion. *J. Biochem.*, Vol. 80, pp. 547-555.
- STEEMANN NIELSEN, E., 1952. The use of radio-active carbon (C¹⁴) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Cons. Int. Explor. Mer*, Vol. 18, pp. 117-140.
- STRICKLAND, J. D. & T. R. PARSONS, 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, No. 167, 310 pp.
- WILLIAMS, P. J. LE B., 1973. The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogenous microbial populations. *Limnol. Oceanogr.*, Vol. 18, pp. 159-165.