



HAL
open science

Séquestration biologique du carbone par les cyanobactéries

Lun Li

► **To cite this version:**

Lun Li. Séquestration biologique du carbone par les cyanobactéries. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10208 . tel-00878524

HAL Id: tel-00878524

<https://theses.hal.science/tel-00878524>

Submitted on 30 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Séquestration biologique du carbone par les cyanobactéries

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 ET DE L'ECOLE
DOCTORALE MATERIAUX DE LYON

SPECIALITE : MATERIAUX

par

Lun LI

Soutenue publiquement le 29 octobre 2010 devant :

Directeurs de thèse : Gilles Dromart et Philippe Oger

JURY : M. Pierre Caumette
M. Philippe Gillet
Mme. Jacqueline Lecourtier
M. Jean-François Minster
M. Gilles Dromart
M. Philippe Oger
M. Frank Haeseler
M. Denis Blanchet

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse
Promoteur de thèse
Co-promoteur de thèse

CONFIDENTIEL

RESUME en français

L'utilisation des microorganismes marins ou terrestres pour la séquestration à long terme du CO₂ est une des solutions envisagées pour diminuer la teneur en CO₂ dans l'atmosphère. Le travail de cette thèse se concentre sur les microorganismes calcifiants, et notamment les cyanobactéries, qui peuvent fixer du CO₂ sous forme de biomasse et carbonate de calcium. Ce dernier, insoluble dans l'eau, précipite et peut donc constituer un puits à long terme. La compréhension des mécanismes de calcification induits par les cyanobactéries et la possibilité de contrôler ces processus sont nécessaires pour développer une technologie de séquestration du CO₂. Cette biotechnologie pourrait constituer une alternative à la technologie de capture et stockage géologique du CO₂.

Synechococcus PCC8806 une souche marine de cyanobactérie purifiée à l'Institut Pasteur de Paris est utilisée comme organisme au cours du travail expérimental réalisé dans le cadre de cette thèse. Le premier résultat important de cette thèse est le développement d'une stratégie analytique ayant permis d'accéder à un bilan de masse carbone et calcium au cours d'une culture de cyanobactérie sur hydrogénocarbonate. La mise en œuvre de cette stratégie au cours de différents essais réalisés dans le cadre de ce travail a permis par ailleurs de quantifier avec précision la production de carbone organique (biomasse) et de carbone inorganique (CaCO₃) en fonction du calcium et du carbone inorganique présent dans les milieux de culture.

Nous avons ensuite étudié la précipitation de la calcite au cours de la croissance de *Synechococcus* PCC8806 en présence de calcium. Pour cela les conditions de culture ont été variées de telle sorte que la survenue des événements de précipitations a pu être comprise ainsi que l'influence de sites de nucléation mis en évidence. Le grossissement des cristaux a également été étudié attentivement par microscopie électronique à balayage.

Une autre partie de ce travail a permis d'identifier la source de carbone inorganique utilisée par *Synechococcus* PCC8806 pour la photosynthèse. Cela a été l'occasion de réécrire les équations liées aux transferts entre le CO₂ atmosphérique et le système carbonaté, ainsi que les équations de photosynthèse en fonction des conditions de disponibilité des deux sources de carbone inorganique (CO₂ et hydrogénocarbonate). De plus ont pu être mis en évidence, les effets des phases diurne et nocturne de la croissance de cyanobactéries sur les équilibres du système carbonaté et le pH. Ce travail a également permis de déterminer les vitesses de croissance des cyanobactéries et donc de calculer des rendements de croissance par unité de surface. Cela permettra à terme d'optimiser la production de biomasse et de calcite dans un procédé industriel.

TITRE en anglais**Biological carbon sequestration by cyanobacteria**

RESUME en anglais

The use of marine or terrestrial microorganisms for long-term sequestration of CO₂ is a possible solution to reduce the CO₂ content in atmosphere. This thesis work focuses on calcifying organisms, in particular the cyanobacteria, which can fix CO₂ as biomass and calcium carbonate. The latter is insoluble in water; precipitates may therefore constitute a long term sink. Understanding of the calcification mechanisms induced by cyanobacteria and the possibility of controlling these processes are necessary to develop a technology for CO₂ sequestration. This biotechnology could be an alternative technology to CO₂ capture and geological storage.

Synechococcus strain PCC8806, marine cyanobacteria purified by the Institute Pasteur de Paris is used during the experimental work in this thesis. The first important result of this work is to develop an analytical strategy that allowed access to a mass balance of carbon and calcium in a cyanobacteria culture on hydrogencarbonate. The implementation of this strategy in various tests of this work has also allowed to accurately quantify the production of organic carbon (biomass) and inorganic carbon (CaCO₃) according to the calcium and Ci introduced (hydrogencarbonate) in the medium.

We then studied the calcite precipitation during growth of *Synechococcus* PCC8806 in the presence of calcium. For that, culture conditions were varied in order to understand the occurrence of precipitation events and the influence of nucleation sites. The development of crystals has also been carefully studied by scanning electron microscopy.

Another part of this work has identified the inorganic carbon source used by *Synechococcus* PCC8806 for photosynthesis. This was an opportunity to rewrite the equations related to transfers between atmospheric CO₂ and the carbonate medium, as well as the equations of photosynthesis depending on the conditions of availability of two sources of inorganic carbon (CO₂ and hydrogencarbonate). In addition, we have revealed the effects of diurnal and nocturnal phases of the growth of cyanobacteria on the carbonate system balance and pH. This work also allowed estimating the cyanobacteria growth rates and thus calculating growth yields per unit area. This will ultimately optimize biomass and calcite production in an industrial process.

DISCIPLINE

Matériaux

MOTS-CLES

Séquestration du carbone, CO₂, cyanobactérie, précipitation, photosynthèse

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : Institut Français du Pétrole Énergies nouvelles; Direction Géologie-Géochimie-Géophysique; Département Géochimie

CONFIDENTIEL

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé dans le cadre d'une thèse IFP réalisée dans les départements Géochimie et Biotechnologie de l'IFP Energies nouvelles (Rueil Malmaison), en collaboration avec ENS de Lyon. Ce travail a bénéficié d'un financement CIFRE.

Cela fait six ans que je suis arrivé en France. J'ai posé mon premier pied sur le sol français, le 14 juillet 2004. A partir de ce moment, je me suis engagé à réaliser tous mes rêves et ceux de mes parents. J'adresse ces remerciements à toutes les personnes qui m'ont soutenu tout au long de ces trois ans de thèse, mais également à toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de mes six années passées en France. En Chine, on dit souvent : les gens qui savent gré des bienfaits des autres, auront toujours la chance de bien vivre. Je vais donc m'exprimer du mieux possible pour profiter de cette occasion.

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse, notamment, M. Pierre Caumette et M. Philippe Gillet qui ont accepté d'en être les rapporteurs, mais aussi Jacqueline Lecourtier et Jean-François Minster qui ont pris sur leur temps précieux pour évaluer ce travail.

Je remercie également Gilles Dromart et Philippe Oger, mes directeurs de thèse à ENS de Lyon, pour leurs contributions à ce travail et leurs conseils stimulants.

Je remercie particulièrement mon promoteur de thèse, Frank Haeseler, tout d'abord pour avoir porté ce sujet ensuite pour m'avoir accueilli au sein du département Géochimie et enfin pour l'intérêt marqué avec lequel il a suivi le déroulement de mes recherches et ses conseils pertinents.

Je tiens à remercier tout particulièrement celui qui m'a instruit, encouragé, aidé au quotidien tout au long de cette thèse, c'est à dire mon co-promoteur du département Biotechnologie, Denis Blanchet, qui a occupé le bureau en face du mien pendant trois ans. Il est un excellent exemple. Je lui adresse mes remerciements pour sa grande disponibilité et ses précieux conseils scientifiques et techniques; mais également pour avoir m'apprié énormément de choses au niveau culturel. Je demande pardon à son épouse, Réjane, pour l'avoir aussi souvent accaparé, je l'égalment remercie pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse.

Je remercie Frédéric Monot de m'avoir accueilli au sein du département Biotechnologie dans lequel tous les essais de culture des cyanobactéries ont été réalisés.

Également, je remercie très vivement, Véronique Bardin du département Biotechnologie, qui m'a accueilli au laboratoire. Je la remercie aussi pour ses aides techniques précieuses, ses conseils d'ami, sa gentillesse et sa patience.

Je suis reconnaissant au personnel du département Géochimie et plus particulièrement à Géremie Letort pour l'utilisation de Rock Eval, Eric Kohler pour son aide précieuse et ses recommandations pertinentes au cours des observations au microscope électronique. Je remercie également Bruno Garcia et Valérie Beaumont pour leurs conseils et leur amitié.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Bertrand Van De Moortele du centre de microscopie de Lyon pour sa pertinente assistance.

Je remercie aussi tous mes collègues du département Biotechnologie qui m'ont apporté leur soutien technique, Fadhel Ben-Chaabane pour m'avoir aidé à effectuer la simulation de la croissance des microorganismes, Bernard Chaussepied pour l'utilisation de l'autoclave, Françoise Le Roux pour l'utilisation de l'analyseur COT. Sans oublier les bons moments passés ensemble avec Alain, Benjamin, Yves, Céline, Nicolas, Remi, Hugues, Marcel et Françoise.

Je tiens à remercier Anne-Marie Davila-Gay, professeur à Agro ParisTech. C'est grâce à elle que j'ai eu cette belle opportunité d'effectuer ma thèse à l'IFP.

Il me faut aussi remercier tous ceux qui m'ont soutenu et fait de moi ce que je suis actuellement. Merci à Evelyne Derens, mon maître de stage au Cemagref, qui m'a ouvert la porte du domaine de recherche; merci à Guy Letang, mon maître de stage au Cemagref, qui m'a appris la curiosité scientifique et m'a donné le goût de la recherche. Merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées depuis que je suis en France, et même aux personnes qui m'ont mis dans des situations délicates sans le faire exprès. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.

Je tiens à remercier infiniment mon épouse WeiTung pour son sens des réalités et son indéfectible amour. Elle a su me soutenir et me supporter pendant ces trois longues années. Dans les moments difficiles, c'est toujours elle qui était à mon côté pour m'encourager. Je voudrais remercier le destin qui a fait que l'on puisse se rencontrer en France. Merci profondément à mes parents, pour leur certitude de me voir réussir et pour m'avoir poussé tout au long de mes études. C'est grâce à eux que j'ai eu la chance de découvrir cette culture différente et de pouvoir vivre cette extraordinaire expérience.

Merci également à tous mes amis, car ils m'ont apporté tellement de joie et de soutiens.

Si j'en oublie, et je suis sûr que c'est le cas, je leur demande humblement pardon.

CONFIDENTIEL

Sommaire

1	Avant-propos	9
1.1	Présentation du travail sur la calcification biologique par les Cyanobactéries....	9
1.1.1	Bio-calcification : niche technologique alternative au CCS?	9
1.1.2	Résultats	11
2	Introduction Générale	13
2.1	Rejet de CO₂ d'origine anthropique dans l'atmosphère et conséquence de l'acidification des océans sur la production primaire et sur le puits de carbone.....	13
2.1.1	Généralités sur le cycle du carbone	13
2.1.2	Production primaire et puits de carbone	23
2.1.3	Bibliographie	43
2.2	Photosynthesis and Calcification in aquatic environments: a review about the role and the behaviour of Cyanobacteria and Coccolithophores	46
3	Matériel et Méthodes	77
3.1	Analyses chimiques	77
3.1.1	Dosage des ions	77
3.1.2	Dosage de Ca ²⁺ dissous dans l'eau par absorption atomique	81
3.1.3	Dosage du CT (carbone total), du CI (carbone inorganique) et du COD (carbone organique dissous)	82
3.1.4	Dosage des espèces hydroxyles, carbonate et hydrogencarbonate dans l'eau ..	86
3.1.5	Dosage du CO ₂ et d'O ₂ gazeux par CPG	90
3.1.6	Analyse élémentaire (CONHS) de la biomasse.....	94
3.1.7	Dosage du carbone minéral (carbonate de calcium) et organique (C _{biomasse}) par la technique d'analyse Rock-Eval	95
3.2	Microbiologie	107
3.2.1	Souches utilisées.....	107
3.2.2	Milieux de culture.....	107
3.2.3	Mise en œuvre des cultures	109
3.2.4	Suivi de la croissance des cyanobactéries	110
3.3	Observation en microscope électronique à balayage	112
3.3.1	Préparation avec fixation des cellules.....	112
3.3.2	Préparation sans fixation des cellules.....	112

4	Résultats.....	115
4.1	Conversion of bicarbonate into biomass and calcium carbonate by the Cyanobacteria strain <i>Synechococcus</i> sp. PCC 8806	117
4.2	Calcite precipitation during growth of <i>Synechococcus</i> sp. strain PCC 8806....	145
4.3	Cyanobacteria culture in bicarbonate system to optimize biomineralization ..	165
5	Conclusions générale	191
5.1	Cycle du carbone et climat	192
5.2	Organismes photosynthétiques et métabolisme du carbone et du calcium.....	194
5.3	Étude de la production de carbonate de calcium par les cyanobactéries	198
6	Perspectives.....	206

CONFIDENTIEL

1 Avant-propos

La première évocation du “réchauffement climatique” remonte au 8 août 1975, dans la revue *Science*¹, sous la plume du scientifique américain Wallace Broecker. L'article, intitulé “*Changement climatique : sommes-nous à la veille d'un important réchauffement climatique ?*”, prédisait que “*les tendances actuelles, plutôt fraîches, déboucheront, dans une dizaine d'années, sur un réchauffement important provoqué par le dioxyde de carbone*”. L'auteur avait tablé sur une augmentation des températures de 0,8 °C sur l'ensemble du XX^e siècle en raison des rejets de CO₂ dans l'atmosphère et s'inquiétait des conséquences sur le niveau des mers et l'agriculture. Depuis, le GIEC s'est exprimé très clairement sur le caractère anthropique du réchauffement de la planète et sur ses conséquences possibles. Actuellement, la plupart des experts estiment en effet que ces risques sont réels et directement reliés aux émissions de gaz à effet de serre, et tout particulièrement de CO₂, lequel a fortement augmenté au cours des récentes décennies. L'Académie des sciences vient également de présenter un rapport sur le climat le 26 octobre 2010.

1.1 Présentation du travail sur la calcification biologique par les Cyanobactéries

1.1.1 Bio-calcification : niche technologique alternative au CCS?

IFP Énergies nouvelles mène depuis quelques années un ensemble d'actions visant à réduire les émissions de CO₂. Il s'agit ainsi de développer et de promouvoir des technologies et des procédés visant à :

- réduire les consommations, en particulier dans le domaine du transport automobile, mais aussi dans l'industrie (procédés plus économes en énergie),
- utiliser des combustibles et carburants émettant moins de CO₂, dont les carburants à plus forte teneur en hydrogène et les biocarburants,
- la capture, transport et stockage géologique du CO₂ (CCS).

L'utilisation des microorganismes marins ou terrestres pour la séquestration à long terme du CO₂ atmosphérique est effectivement une des solutions envisagées par plusieurs groupements de recherche dans le monde. Les recherches actuelles se concentrent sur les

¹ Wallace S. Broecker (1975) Climatic Change: Are We on the Brink of a Pronounced Global Warming? *Science*, Vol. 189, No. 4201 pp. 460-463.

microorganismes calcifiants, et notamment les cyanobactéries, car elles peuvent réaliser la fixation du CO₂ atmosphérique sous forme de biomasse et de carbonate de calcium insoluble dans l'eau. Sous l'intitulé "*Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage*" (in Current Opinion in Biotechnology, 2010²), Christer Jansson et Trent Northen évoquent la possibilité d'utiliser la calcification biologique par les microalgues (biominéralisation) comme une alternative à la technologie CCS. Cette biotechnologie pourrait être vue comme une technologie alternative qui pourrait être associée à des entités industrielles à faibles et moyennes émissions de gaz riches en CO₂, comme les cimenteries, les aciéries, les incinérateurs urbains, etc... pour capter et séquestrer ce CO₂.

La présente thèse s'est concentrée sur l'étude des cyanobactéries du genre *Synechococcus* comme modèle d'organisme calcifiant plutôt que sur celle des coccolithophores pour plusieurs raisons :

- la précipitation de la calcite est directement liée à croissance des cyanobactéries, il s'agit d'un processus physico-chimique consécutif à la photosynthèse. Les connaissances par contre sur la calcification biologique des cyanobactéries en relation avec les conditions de l'environnement sont encore limitées.
- les mécanismes de genèse de coccolite par des coccolithophores sont assez connus. Il s'agit d'un processus génétiquement contrôlé, qui surviendrait dans des conditions de limitation d'azote quand l'algue ne peut plus faire de biomasse alors qu'elle continue la photosynthèse. Ce mécanisme nécessite aussi un transport de calcium au sein de la cellule.

Dans l'optique de la séquestration microbiologique du CO₂ par les microorganismes, l'examen de la littérature (qui est conséquente) fait apparaître plusieurs grands axes de recherche dont :

- un premier concerne l'histoire actuelle, et en particuliers les effets de l'acidification des océans sur l'écosystème marin,
- un deuxième concerne l'histoire passée, en particulier les changements au sein de l'atmosphère (passage de 1 à 21 % de la teneur atmosphérique en oxygène, entre

² Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage" in Current Opinion in Biotechnology 2010, 21:365–371

l'archéen et le protérozoïque) et concernant les accumulations carbonatés (type stromatolithes),

- un troisième concerne les mécanismes de production des blooms de coccolithophores³ et des whittings par les cyanobactéries, et
- un quatrième axe qui concerne la production de biomasse alguaire dans l'optique de la production de biocarburant (algues lipidiques) et d'énergie (méthanisation).

1.1.2 Résultats

Ce manuscrit de thèse sur la calcification biologique par les cyanobactéries se présente en plusieurs parties :

Une première partie intitulée : *Cycle du carbone : effet de l'acidification sur la production primaire et le puits de carbone*. Elle aborde les questions relevant de la problématique du cycle du carbone en relation avec le rejet massif de CO₂ d'origine anthropique dans l'atmosphère, en s'intéressant aux échanges Atmosphère/Océans, à l'acidification des océans, ainsi qu'aux conséquences de cette acidification sur la production primaire (assimilation photosynthétique de l'hydrogénocarbonate en milieu marin) et sur le puits de carbone (sédimentation de carbonate de calcium en milieu marin). Elle est essentiellement d'intérêt pédagogique pour donner des clés de compréhension au lecteur, et représente la première partie de l'introduction générale.

Une deuxième partie intitulée : *Photosynthesis and calcification in aquatic environments: a review about the role and the behaviour of Cyanobacteria and Coccolithophores*. Il s'agit d'un article de synthèse abordant les métabolismes développés par deux grands groupes taxonomiques, par le biais de deux représentants, cyanobactérie et coccolithophore. Ces deux organismes utilisent l'hydrogénocarbonate présent dans l'eau de mer comme source de carbone, l'utilisation du calcium par ces deux organismes s'effectuant par contre de manière totalement différente, pour la fabrication de calcite non structurée (cyanobactérie) et de test (coccolithophore). Cette partie permet de mieux éclairer les questions liées à la survenue des blooms de coccolithophores et des whittings de cyanobactéries. Cet article présenté dans la deuxième partie de l'introduction générale est soumis à la revue de l'IFP Energies Nouvelles – "Oil & Gas Science and Technology".

³ Coccolithophore : eucaryotes planctoniques à test carbonaté.

Une troisième partie intitulée : ***Conversion of hydrogenocarbonate into biomass and calcium carbonate by the Cyanobacteria strain Synechococcus sp. PCC 8806.*** Cette partie propose une stratégie analytique permettant d'accéder à un très bon recouvrement carbone et calcium. Appliquée à différentes combinaisons de calcium et de bicarbonate, cette stratégie permet par ailleurs de quantifier avec précision la production de carbone organique (biomasse) et de carbone inorganique (CaCO_3) en fonction du calcium et du Ci (hydrogénocarbonate). Cette partie est présentée en premier dans le chapitre de résultat sous la forme d'un article qui est soumis à la revue "Applied Geochemistry".

Une quatrième partie intitulée: ***Calcite precipitation during growth of Synechococcus sp. strain PCC 8806.*** Cette partie aborde les conditions de survenue de la précipitation de carbonate de calcium (onset) et les aspects liés au besoin supposé de sites de nucléation. Les phases de grossissement des cristaux y sont également étudiées de près. Cette seconde partie de résultat n'est pas présentée sous la forme d'un article. Des développements expérimentaux sont en cours pour compléter les informations concernant les processus de précipitation associés à la croissance des cyanobactéries.

Une cinquième partie intitulée : ***Cyanobacteria culture in bicarbonate system to optimize biomineralization.*** Cette partie aborde la source de carbone (CO_2 et hydrogénocarbonate) en vue d'une production optimisée de calcite. Elle a été l'occasion de réécrire les équations liées aux transferts entre le CO_2 atmosphérique et un milieu carbonaté, ainsi que les équations de photosynthèse en fonction des conditions de disponibilité de ces deux sources de carbone inorganique. Elle permet également d'avoir accès aux vitesses de croissance des cyanobactéries. Cette troisième partie des résultats est sous la forme d'un article soumis à la revue "Environmental Science & Technology".

Les soumissions des articles aux revues sont conditionnées au dépôt de brevets prévus pour une date précédant la soutenance de la thèse

2 Introduction Générale

2.1 Rejet de CO₂ d'origine anthropique dans l'atmosphère et conséquence de l'acidification des océans sur la production primaire et sur le puits de carbone

2.1.1 Généralités sur le cycle du carbone

2.1.1.1 Réservoirs de carbone

Le carbone sous sa forme oxydée (inorganique: dioxyde de carbone, bicarbonates et carbonates), joue un rôle important dans différents processus terrestres comme l'altération chimique des minéraux et la formation des sols, l'acidification des sols et des eaux, la précipitation chimique des carbonates, et deux processus qui nous intéressent plus particulièrement : la **photosynthèse** (transformation du carbone minéral en carbone organique) et la **bio-minéralisation** (formation de carbonates de calcium ou de Ca/Mg par les organismes vivants).

Le carbone sous sa forme réduite (organique) est un élément constitutif des organismes vivants, de la matière organique des sols, de la matière organique sédimentaire fossilisée (kérogène et charbon) et de ses dérivés tels que le pétrole et le gaz naturel. Une fraction peut être considérée comme ayant un turn-over court (recyclage des organismes vivants), la matière sédimentaire fossilisée représentant un carbone organique dont le turn-over est supérieur à plusieurs millions d'années.

La répartition des différents réservoirs de carbone sur la planète est rassemblée dans le Tableau 1 synthétisé d'après Anderson et Arthur (1983), Hedges et Keil (1995), Javoy (1998).

Tableau 1: Les Réservoirs de carbone

Atmosphère, Biosphère, Hydrosphère		
Inorganique	CO ₂ atmosphérique	0,66×10 ³
	Océan (Carbone dissous, DIC)	38×10 ³
	Carbonate des sols	1,1×10 ³
Organique	Matière organique des sols	1,6×10 ³
	Tissus des plantes terrestres	0,95×10 ³
	Océan (carbone dissous, DOC)	0,60×10 ³
	Sédiments superficiels	1,0×10 ³

Roches sédimentaires		
Inorganique	Carbonates	60×10^6
Organique	Matière organiques sédimentaires (dont kérogène, charbon, pétrole, gaz)	15×10^6
Croûte continentale		
Croûte continentale siliceuse		7×10^6
Manteau		
Manteau supérieur		$\sim 5 \times 10^8$

Unités : gigatonnes (Gt) = milliard de tonne.

➤ **Les aires continentales**

Au niveau des aires continentales, la teneur en carbone inorganique et organique est représentée par la matière organique du sol, les tissus des plantes terrestres, les carbonates des sols et le sédiment superficiel. Cela représente un réservoir de l'ordre de 4 650 Gt de carbone.

➤ **Les océans**

Au niveau des océans, les eaux intermédiaires et les eaux profondes des océans sont de loin le réservoir de carbone le plus important de la Terre. Les réserves de carbone sont représentées essentiellement par le carbone inorganique dissous (38 000 Gt), essentiellement sous forme de bicarbonate.

➤ **Réservoir sédimentaires**

Le réservoir majeur de carbone est constitué par les sédiments, qui contiennent 75×10^6 Gt de carbone, dont 60×10^6 sont inorganiques (carbonates) et 15×10^6 sont organiques (matières organiques sédimentaires). On doit noter que les réserves de pétrole, de gaz naturel, et de charbon exploités par l'homme représentent un réservoir de carbone inférieur d'au moins trois ordres de grandeur (qui s'exprime en milliers de Gt) à celui de la totalité de la matière organique sédimentaire.

Notons que cette description "classique" des réservoirs carbonés sur terre ne prend pas en compte le réservoir constitué par le manteau terrestre. Or ce réservoir, estimé à 5×10^8 Gt par Javoy (1982), pourrait être beaucoup plus important que décrit précédemment. Les flux échangés entre le carbone du manteau et le carbone atmosphérique semblent actuellement équilibrés aux environs de 0,08 - 0,3 Gt/an (Javoy et al, 1982), avec un temps de résidence dans le manteau de l'ordre de 3 milliards d'années. Ce régime stationnaire n'est probablement pas la règle tout au long de l'histoire de la Terre. Ainsi les flux d'entrée dans l'atmosphère

auraient été plus importants lors de la mise en place des LIP (*Large Igneous Province*⁴). Ces flux d'entrée sont le résultat d'épisodes brefs mais intenses de volcanisme intraplaques, et s'accompagne de rejets massifs de CO₂ dans l'atmosphère. Ces décharges de CO₂, localisés dans le temps, pourraient avoir joué un rôle dans les grandes crises biologiques et les extinctions de masse (Keppler *et al*, 2003).

2.1.1.2 Flux de carbone entre les différents réservoirs

La surface de la terre (océan, atmosphère, biomasse, sols, sédiments superficiels) représente un réservoir de carbone qui n'est "que" de l'ordre de 44×10^3 Gt de carbone (inorganique plus organique), et dont la plus grande partie (38×10^3 Gt) se trouve présente sous la forme de bicarbonates dissous dans l'eau de mer. Bien que de taille réduite, ces réservoirs superficiels de carbone sont l'objet d'une forte dynamique se traduisant par une "interaction" avec le climat. Le carbone, largement impliqué dans les interactions atmosphère-biosphère-hydrosphère-lithosphère, est constamment recyclé entre les réservoirs continents et océans, et aussi entre ses formes organique et inorganique. La dynamique du CO₂ atmosphérique est principalement modulée par les processus biologiques de photosynthèse, de respiration et de décomposition de la matière organique et par la variabilité des échanges du CO₂ entre l'océan et l'atmosphère (cf. Figure 1). L'atmosphère joue de ce point de vue un rôle majeur dans les échanges du CO₂ à l'échelle globale de la Terre. Les modifications complexes des flux et des réservoirs biogéochimiques du carbone entre ces compartiments sont à l'origine des fluctuations, maintenant bien documentées, du CO₂ atmosphérique au cours des cycles glaciaires du Pléistocène (- 1,75 millions à - 10000 années).

4 : **Large Igneous Provinces** (LIP) sont définies par Coffin and Eldholm (1992) comme des aires à la surface de la planète qui contiennent d'immenses quantités de roches magmatiques (typiquement des basaltes) issues de processus éruptifs ayant eu lieu sur des périodes de temps très courtes à l'échelle de l'âge de la terre, de l'ordre de quelques millions d'années.

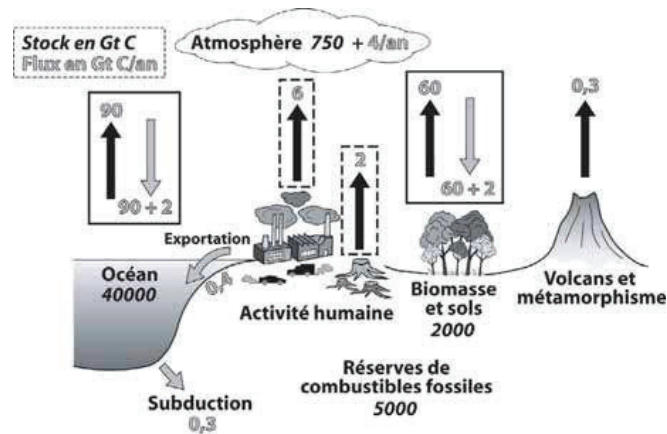


Figure 1 : Cycle actuel du carbone : les chiffres en italique noir correspondent aux tailles des réservoirs (en Gt), les autres chiffres en grisé correspondent aux données de flux (en Gt/an). Modifié d'après Prieur et Combarous (2003) et Gaillardet (2005).

Comme on vient de le mentionner, les principaux processus vecteurs de transfert du carbone entre l'atmosphère et les sols sont la photosynthèse et la respiration. Les quantités de carbone échangées par ces deux processus sont considérables (60 Gt) et représentent plus de dix fois les quantités introduites dans l'atmosphère par l'utilisation humaine de combustibles fossiles (8 Gt).

Au niveau des océans, les échanges de CO_2 sont très largement régis par la température des eaux de surface, la circulation atmosphérique (vents), les courants marins, ainsi que par les processus de photosynthèse et de respiration. Ces flux sont estimés autour de 90 Gt C par an entre l'océan et l'atmosphère. Le CO_2 se dissout facilement dans les eaux et la capacité de stockage des océans dépend donc de la température et de la réserve alcaline. Les basses températures favorisent la solubilisation du CO_2 dans l'eau de surface, alors que les eaux chaudes, au contraire, favorisent le dégazage du CO_2 vers l'atmosphère. La réserve alcaline exprime la teneur en carbonate de l'eau de mer.

Les conditions actuelles de circulation générale (circulation thermo-haline) des océans permettent aux eaux polaires froides et denses de transférer des eaux de surface riches en CO_2 vers l'océan profond (rôle de puits de carbone). Les "résurgences" tropicales, qui ramènent ces eaux vers la surface, se traduisent par un retour du CO_2 vers l'atmosphère. Ce cycle a une durée de plusieurs centaines d'années. Les conditions climatiques et les échanges atmosphère/océan sont probablement les facteurs prépondérants des variations de la teneur atmosphérique qui ont accompagnés les cycles glaciaires-interglaciaires au cours du Pléistocène.

La biomasse des océans consomme d'énormes quantités de carbone minéral (principalement sous la forme de bicarbonate) et libère par ailleurs aussi d'énormes quantités de CO₂. Cependant, contrairement aux aires continentales, le cycle du carbone entre la photosynthèse et la respiration est très rapide. On peut considérer qu'il n'y quasiment pas de stockage de carbone associé à la biomasse marine, comme c'est le cas sur les continents. Cependant une infime partie du carbone résiduel provenant de ce plancton atteint le sédiment, où il peut être fossilisé (ce mécanisme est détaillé au paragraphe 2.1.2.3). Néanmoins le puits de carbone associé à ce mécanisme de fossilisation est important lorsque l'on considère ce phénomène sur de longues périodes de temps.

2.1.1.3 Histoire géologique du carbone (CO₂), Temps anciens

Il apparaît nécessaire aujourd'hui de comprendre les conséquences du changement climatique annoncé sur les cycles biologiques et géochimiques du carbone. Pour cela il est essentiel de revisiter les parties insuffisamment connues du cycle du carbone. Un aspect insuffisamment exploré est la dimension géologique de l'élément carbone. Il est aujourd'hui clair qu'au cours de l'histoire géologique de la terre des variations de la teneur atmosphérique en CO₂, ne faisant intervenir que des processus naturels, ont été considérables.

Le modèle simulant cette histoire de l'évolution des teneurs en CO₂ dans l'atmosphère, qui est le plus classiquement cité, est celui de Berner : Geocarb5 (Berner et Kothavala, 2001) (cf. Figure 2). Ce modèle stipule que l'altération des roches à la surface de la terre est le mécanisme principal qui régule la teneur en CO₂ de l'atmosphère. Ce modèle Geocarb⁵ inclut une loi qui lie la température moyenne de la terre à la teneur en CO₂ de l'atmosphère et à l'altération des roches. Cette loi implique que l'altération des roches et la précipitation du carbonate de calcium qui en découle augmente lorsque la température augmente (Brady et Carroll, 1994). La chaîne des processus réactionnels mis en œuvre est la suivante :

- Teneur élevée en CO₂ → Température élevée
- Altération intense des roches
- Précipitation de carbonates élevés
- Baisse de la teneur en CO₂

C'est en quelque sorte l'hypothèse du thermostat, qui stipule qu'en réponse à une augmentation de la température terrestre, les vitesses d'altération des roches augmentent, ce qui a pour conséquence de provoquer une consommation accrue de CO₂ (par précipitation de

carbonates) et donc un retour à la normale. Cela expliquerait que malgré les crises périodiques de métamorphismes (liées aux épisodes d'orogénèse), et malgré l'augmentation régulière de l'énergie que la terre reçoit du soleil, la surface de la terre soit restée dans une gamme de température relativement restreinte, bien que celle-ci ait permis l'instauration de périodes globalement froides (Terre "igloo" ou "snow ball") et de périodes globalement chaudes (Terre "serre").

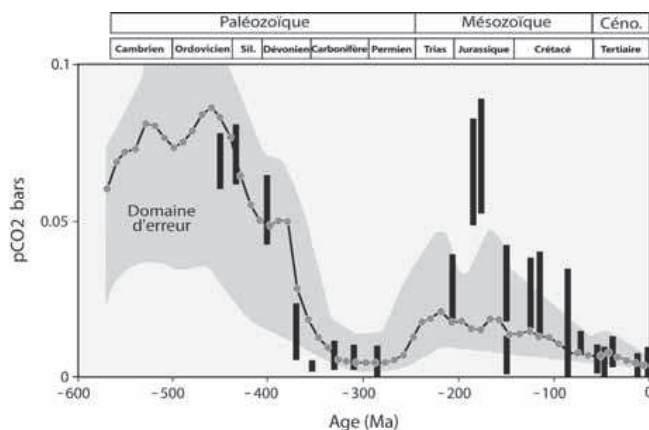


Figure 2 : Modèle de Berner (1983). Les barres verticales correspondent aux données obtenues à partir de la composition isotopique des carbonates de sols fossiles et les indices de stomates.

Dans l'état actuel des connaissances, nous ne disposons pas de marqueurs sédimentaires entièrement fiables de la teneur en CO_2 des atmosphères anciennes. L'atmosphère primitive de la terre pendant la période précédant le Phanérozoïque (Précambrien) était probablement très chargée en CO_2 (50 à 100 mbar de pression partielle). Pendant les trois premiers milliards d'année de l'histoire de la terre, ces quantités gigantesques de CO_2 ont été piégées. Les processus à l'œuvre, impliquent probablement la précipitation et la bio-précipitation passive ou bioactive des carbonates.

Pendant le Phanérozoïque, les teneurs en CO_2 de l'atmosphère ont variées considérablement, les augmentations étant fort probablement liées à des accélérations des processus tectoniques et des émissions de CO_2 associées : volcanisme et métamorphisme. Au cours des deux périodes les plus récentes (Paléozoïque et Mésozoïque), les concentrations en CO_2 dans l'atmosphère ont été ramenées à des valeurs faibles, toutefois encore supérieures aux valeurs actuelles.

5 Le modèle Geocarb inclut comme paramètre le taux de dégazage de la terre, pris comme proportionnel à la quantité de croûte océanique formée au cours du temps.

Les teneurs en CO₂ atmosphérique actuelle sont très faibles par rapports aux teneurs vérifiées et modélisées aux âges plus anciens de la terre, comme pendant le Paléozoïque, il y a -543 à -250 millions années, (10 à 15 fois la teneur actuelle) et le Mésozoïque, il y a de -251 à -65 millions années, (5 à 6 fois). Les processus (actuels) de consommation de CO₂ font intervenir l'altération chimique des roches, surtout de roches silicatées, et l'accumulation de carbonate et de matière organique sédimentaire.

2.1.1.4 Temps modernes : Interactions Atmosphère et Océans

➤ ***Augmentation du CO₂ dans l'atmosphère.***

Durant le passé récent, environ 10.000 ans avant la période industrielle, les concentrations atmosphériques en CO₂ ont oscillées entre 200 et 280 ppmV. Les concentrations actuelles en CO₂ approchent 380 ppm. Ce sont le résultat de l'activité humaine et de l'utilisation des sources fossiles de carbone (gaz, charbon et pétrole) (cf. Figure 3).

Depuis un peu plus de vingt ans, la question du changement climatique a pris une place prépondérante au sein de notre société. On note déjà, à l'échelle du globe, une hausse des températures moyennes de l'atmosphère et de l'océan, une fonte massive de la neige et de la glace et une élévation du niveau moyen de la mer) (cf. Figure 4). Actuellement, la plupart des experts estiment que ces risques sont réels et directement reliés aux émissions des gaz à effet de serre, et principalement le CO₂ (GIEC, 2007).

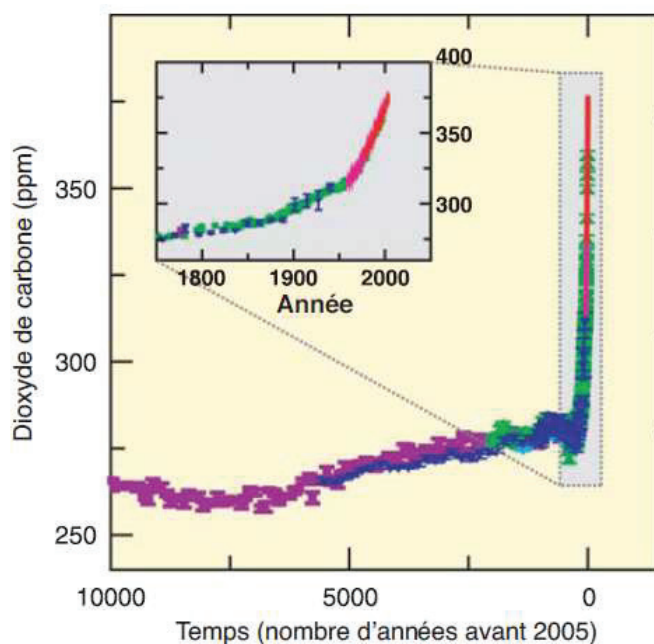


Figure 3 : Concentrations atmosphériques de CO₂ durant les 10 000 dernières années (grand graphique) et depuis 1750 (médaillon). Les mesures proviennent des carottes de glace (symboles de couleurs différentes correspondant aux diverses études) et d'échantillons atmosphériques (lignes rouges) (GIEC, 2007).

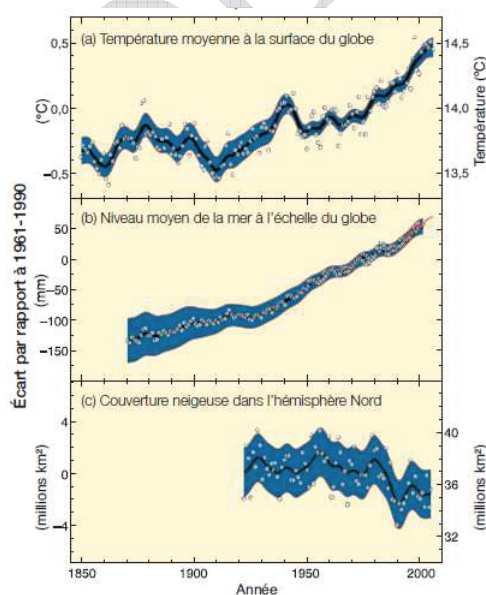


Figure 4: Variations observées a) de la température moyenne à la surface du globe, b) du niveau moyen de la mer à l'échelle du globe, selon les données recueillies par les marégraphes (en bleu) et les satellites (en rouge), et c) de la couverture neigeuse dans l'hémisphère Nord en mars-avril. Tous les écarts sont calculés par rapport aux moyennes pour la période 1961-1990. Les courbes lissées représentent les moyennes décennales, et les cercles correspondent aux valeurs annuelles. Les zones ombrées représentent les intervalles d'incertitude qui ont été estimés à partir d'une analyse poussée des incertitudes connues (a et b) et à partir des séries chronologiques (c) (GIEC, 2007).

➤ **Impact de l'augmentation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère sur l'équilibre carbonate de l'eau de mer**

Les océans jouent un rôle primordial vis à vis du CO₂, car ils représentent un immense réservoir naturel pour cet élément (38.000 Gt). On considère que la moitié du CO₂ issu de la combustion du carbone fossile (charbon, hydrocarbures, méthane) et des activités humaines en général, est restée dans l'atmosphère, et que l'autre moitié a été piégée, à hauteur de 60 % par les océans, et à hauteur de 40 % par la biosphère terrestre. Pour les océans, l'importance du piégeage a été évaluée à 118 ± 19 petagrammes C (petagramme = 10¹⁵ g) (soit 118 Gt) entre 1800 et 1994 (Feely et al, 2004).

Des projections apportées par le "Intergovernmental Panel on Climate Change emission scenarios and general circulation models" donnent des valeurs de 800 ppmV dans l'atmosphère à la fin du 21^{ème} siècle. Dans ces conditions les modèles actuels prévoient une augmentation de 12 % de la teneur en carbone inorganique dissous (CID) dans les eaux de surface des océans, avec une diminution de l'ordre de 60 % de la concentration de l'espèce carbonate (la concentration actuelle en carbonate est de 272 µM). Cela correspond à une diminution de l'ordre de 0,4 unité pH des eaux de surface des océans (cf. Figure 5).

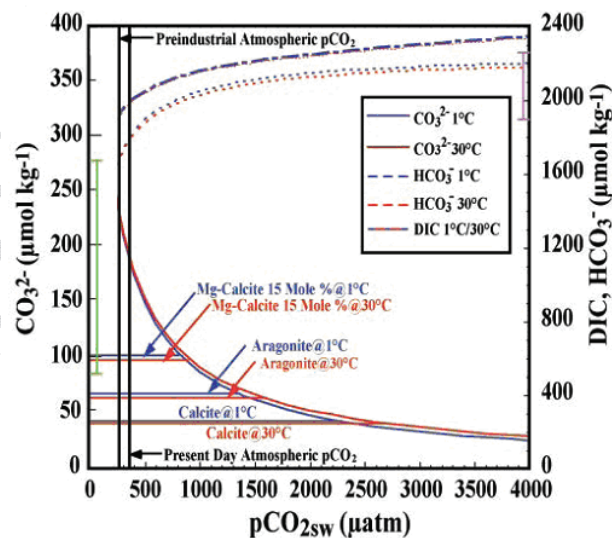


Figure 5: Relation entre les concentrations des différentes espèces carbonatées dans l'eau de surface pour une salinité et une valeur du titre alcalimétrique constant, en fonction de la pCO₂ (en µatm) à la surface des océans. Le trait vertical vert montre la gamme actuelle de concentration de l'ion carbonate observée dans les océans. Le trait vertical mauve (en haut à droite) montre la gamme actuelle de concentration du DIC observée dans les océans. Les trois séries de lignes horizontales montrent les concentrations à l'équilibre des ions carbonates pour les saturations pour la Mg-Calcite, l'Aragonite, et la Calcite, respectivement (Feely et al., 2004).

➤ **Conclusions**

Le cycle du carbone apparait donc comme étant lié de près au climat.

d'une part le piégeage du CO₂ par les océans via le déplacement de l'équilibre carbonate/bicarbonate régule l'accumulation des gaz à effet de serre dans l'atmosphère contrôlant ainsi en partie le réchauffement global de la planète lié au CO₂,

d'autre part le taux de piégeage du CO₂ par les océans est à son tour affecté par le changement climatique, au travers de changements dans les processus biogéochimiques et physiques de l'océan (Lo Monaco et al., 2005).

Des estimations concernant les évolutions dans les décennies à venir, d'une part de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère, et d'autre part des capacités du piégeage du CO₂ par les océans sont cruciales pour appréhender l'évolution du climat lié à l'effet de serre.

Le piégeage du CO₂ doit être examiné au travers des changements qui peuvent s'opérer dans les processus biogéochimiques et physiques de l'océan. Les capacités de piégeage du CO₂ ne sont pas en effet simplement le jeu de deux variables : la température globale du globe et de l'eau (qui conduit à un dégazage avec la hausse de température) et le rapport des concentrations en ions carbonate et bicarbonate de l'eau de mer. L'augmentation de température globale du globe va se traduire en fait par des évolutions locales très variables au niveau de différentes zones équatoriales, subéquatoriales, polaires, etc..., ce qui risque de modifier complètement la cartographie actuelle de l'activité de production primaire (voir chapitre 2.1.2). La circulation atmosphérique et la circulation marine peuvent également être modifiées. En dehors d'une possible modification de sa cartographie, la production primaire pourrait être affectée par l'élévation de la température et la diminution du pH de l'eau de mer (en plus ou en moins ?) et donc la part de carbone minéral qui au travers de l'activité de photosynthèse conduit à la production de carbonates (voir chapitre 2.1.2).

Les modèles océaniques visant à prédire l'évolution du climat sont limités (entre autres) par l'incapacité à paramétrer dans le temps et l'espace les activités biologiques contribuant à la production de carbonate de calcium au regard de l'évolution attendue du pH (risques de dissolution des carbonates) et de la pression partielle en CO₂ dans la couche limite atmosphère/océan (impact sur la pompe à carbonate).

Dans ces conditions la prévision des évolutions du carbone inorganique dissous et de l'alcalinité totale dans les océans est devenue un enjeu scientifique majeur et fait l'objet de nombreux travaux. Les principales questions concernent:

- la production primaire et ses acteurs, en détaillant les organismes à coquille (ou test) nécessitant la présence de calcium ou de silicium, et les organismes dits "calcifiants" dont la production de carbonate est une conséquence de leur métabolisme sans être essentielle à leur croissance,
- les répercussions des variables citées ci dessus (pH et pCO₂) sur l'équilibre de l'ensemble des acteurs de cette production primaire,
- la répercussion sur la sédimentation de carbone (puits de carbone).

2.1.2 Production primaire et puits de carbone

La formation de matière organique dans l'océan commence par la photosynthèse. Cette production de matière organique, appelée **production primaire (photosynthétique)**, utilise l'énergie lumineuse pour réduire différents composés inorganiques, tels que le carbone sous forme de bicarbonate et de CO₂ dissous, l'azote sous forme de nitrate NO₃⁻, ou le phosphore sous forme de phosphate PO₄³⁻. La production primaire océanique est à la base de l'immense majorité des chaînes alimentaires marines et contrôle les cycles biogéochimiques (carbone, azote, phosphore, soufre...). La photosynthèse marine correspond à environ la moitié de l'activité globale de photosynthèse de la planète, le reste provenant de la photosynthèse terrestre. Elle aboutit à une production de carbone organique (biomasse) et de CaCO₃ (tests ou coquilles de certains organismes phytoplanctoniques).

2.1.2.1 Les acteurs et le contrôle de la production primaire

➤ *Les acteurs*

Le plancton est le terme pour décrire les organismes végétaux (phytoplancton) et animaux (zooplancton) qui vivent dans l'environnement aquatique. Le phytoplancton représente les **producteurs primaires** des océans. Ces organismes photosynthétiques vivent dans les 30 premiers mètres de l'océan, dans une zone appelée zone photique (où la lumière pénètre). Ils convertissent le carbone minéral en carbone organique en récupérant l'énergie provenant de la lumière par le biais de la photosynthèse. Le dioxyde de carbone et l'hydrogénocarbonate sont les deux seules sources de carbone pour les organismes

photosynthétiques. Ces organismes photosynthétiques ne peuvent utiliser les ions carbonate comme source de carbone pour la synthèse de biomasse.

La distribution de taille de l'ensemble de ces microorganismes phytoplanctoniques est assez variable, allant de 2 à 5 μm . On parle également de picoplancton photosynthétique (aussi appelé picophytoplancton) qui représente la fraction du phytoplancton dont la taille est comprise entre 0,2 et 2 μm (picoplancton). Ce dernier est particulièrement important dans les zones centrales océaniques dites oligotrophes (très pauvres en nutriments et par conséquent très pauvres en phytoplancton). Chaque population picoplanctonique occupe une niche écologique différente dans le milieu océanique. Les populations de picoplancton semblent régulées non seulement par la prédation, mais aussi par de très nombreux virus spécifiques que l'on commence seulement à découvrir, et que certains classent dans le nanoplancton et plus précisément dans le Femtoplancton ($<0,2 \mu\text{m}$), bien qu'ils ne soient généralement pas considérés comme des organismes vivants. La très petite taille du picoplancton rend difficile son étude par les méthodes classiques, dont la microscopie optique. On a donc recours à d'autres méthodes ; comme la cytométrie en flux, la microscopie à épifluorescence, l'analyse des pigments ou encore l'analyse de marqueurs moléculaires (protéines, lipides, glycolipides, phospholipides...) ou même d'acides nucléiques. (Stockner, 1988; Lebaron and Nicolas, 2003).

Le phytoplancton eucaryote a été pendant longtemps et est encore l'objet de réévaluations incessantes à la fois pour ce qui concerne les représentants de cette communauté et pour l'importance de son implication dans la fixation du carbone à l'échelle de la planète. Dans de nombreux milieux océaniques, les espèces dominantes de picoplancton eucaryote demeurent encore inconnues.

L'introduction de la biologie moléculaire en océanographie a révolutionné la connaissance des écosystèmes océaniques. Les études de biologie moléculaire ont permis de révéler la très grande diversité de ce picoplancton. Ces approches mises en œuvre dès les années 1990 pour les bactéries, (Pace, 1997) n'ont été appliquées aux picoeucaryotes photosynthétiques que 10 ans plus tard (Diez et al., 2001). Pour la première fois, on a pu déterminer la composition du compartiment picoplanctonique sans avoir ni à l'observer, ni à le cultiver. La génomique a permis de franchir une étape supplémentaire (*la génomique consiste à déterminer la séquence complète du génome d'un organisme et à répertorier tous les gènes présents*). Ainsi on peut avoir une idée des capacités métaboliques de l'organisme ciblé et comprendre comment il s'adapte à son environnement. En parallèle, on commence aussi à faire des analyses génomiques directement à partir d'échantillons d'eaux (écogénomique ou

métagénomique), ce qui permet d'accéder aux génomes d'organismes non cultivés (DeLong, 2005).

A ce jour, les génomes de plusieurs souches de *Prochlorococcus* et de *Synechococcus* et d'une souche d'*Ostreococcus* ont été déterminés, alors que ceux de plusieurs autres cyanobactéries et de petits eucaryotes (*Bathycoccus*, *Micromonas*) sont en cours d'analyse (Courties et al., 1998; Palenik et al., 2003; Rocap et al., 2003; Derelle et al., 2006; Bellec et al., 2009).

On résume communément, (et peut être à tort) le micro-phytoplancton aux dinoflagellés, aux coccolithophores, aux diatomées (phytoplancton eucaryote) et aux cyanobactéries (phytoplancton procaryote).

Les **diatomées**⁶ constituent les représentants les plus connus du phylum Heterokontophyta. Ces organismes eucaryotes présentent une coquille à base de silice (frustule) et possèdent des chloroplastes. Les **dinoflagellés** appartiennent au phylum Chromalveolata. Près de la moitié de ces dinoflagellés sont photosynthétiques et représentent la communauté la plus importante des micro-algues eucaryotes après celle des diatomées. Enfin les **coccolithophores** sont parmi les représentants les plus importants de Haptophyta. Ils présentent un exosquelette composé de plaques de carbonate de calcium appelé coccolites.

Les **cyanobactéries**, appelées incorrectement algues bleues, sont des procaryotes et se distinguent des eucaryotes par l'absence de noyau, de mitochondries et de chloroplastes. Ils appartiennent au picophytoplancton, c'est à dire à la fraction la plus petite du phytoplancton. Ils comprennent les genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*.

Les cyanobactéries du genre **Synechococcus** d'une taille de 1 µm (micromètre) ont été découvertes en 1979, mais ne dominent que dans les zones mésotrophes, par exemple au voisinage de processus de "remontée d'eau" («ou upwelling») équatoriale ou en milieu côtier. Latitudinalement, elles sont ubiquistes, s'étendant des régions polaires à l'équateur.

Les cyanobactéries du genre **Prochlorococcus** sont particulièrement remarquables. D'une taille de 0,6 µm, *Prochlorococcus* n'a été découvert qu'en 1988 par des chercheurs américains (Chisholm et al., 1988). Malgré sa petite taille, cet organisme photosynthétique est sans doute le plus abondant de la planète terre: en effet sa densité peut atteindre jusqu'à 100

6 Les diatomées sont des algues jaunes et brunes unicellulaires caractérisées par le fait qu'elles sont les seuls organismes unicellulaires à posséder une structure externe siliceuse enveloppant totalement la cellule. Transparente et rigide, cette enveloppe, appelée frustule, est associée à des composants organiques et est formée de deux thèques emboîtées à symétrie remarquable; la silice qui la compose est faiblement cristallisée (semblable à du verre).

millions de cellules par litre et on peut le rencontrer jusqu'à 150 m de profondeur dans toute la ceinture intertropicale. *Prochlorococcus* remplace *Synechococcus* dès que le milieu s'appauvrit (c.à.d. devient oligotrophe). Par contre en région tempérée (par exemple dans l'Atlantique Nord), *Prochlorococcus* est absent car les eaux trop froides ne favorisent pas son développement.

D'autres cyanobactéries sont également présentes en milieu phytoplanctonique marin et notamment les cyanobactéries filamenteuses qui sont connues pour biominéraliser aussi, telles que *Arthrospira*, *Trichodesmium*, *Spirulina*, *Nodularia*. Enfin il faut mentionner les bactéries filamenteuses qui forment les tapis bactériens et qui sont également décrites comme de bons biominéralisateurs, comme *Microcoleus*, *Phormidium*, *Tychonema*, *Anabaena*, etc.....

La capacité à fixer l'azote atmosphérique est présente chez une partie des Cyanobactéries, notamment des bactéries filamenteuses.

➤ ***Le contrôle de la production primaire***

A côté de la température, qui module toute activité métabolique, les régulateurs de la production primaire marine diffèrent notablement de ceux qui influencent les végétaux terrestres ; en effet en mer, ni la teneur en CO₂, ni le manque d'eau n'interviennent.

Au niveau de l'océan, des mesures systématiques ont montré que l'activité biologique modifiait la teneur en oxygène, en carbone inorganique, en azote, et en phosphore des eaux de mer dans un rapport stœchiométrique constant, appelé *rapport de Redfield* (Redfield, 1958). Les valeurs actuellement admises de ce rapport sont :

$$DO/DC/DN/DP = -172/106/16/1$$

Cela signifie que pour un atome de P utilisé lors de la photosynthèse (ou oxydé par l'activité bactérienne), 16 atomes de N et 106 atomes de C sont consommés (oxydés et dissous) et que 172 atomes d'oxygène sont produits. La mesure des variations dues à l'activité biologique d'un de ces éléments permet donc d'évaluer les variations des trois autres.

La production photolithotrophe dépend de l'énergie lumineuse disponible, de la quantité d'ions minéraux ou nutriments, et de l'abondance du zooplancton prédateur.

❖ **L'énergie lumineuse disponible.**

La lumière pénètre sous la surface de la mer et y est diffusée et absorbée par l'eau et les pigments du phytoplancton, principalement de la chlorophylle et des carotènes. Les bandes spectrales rouges étant absorbées par les pigments, la répartition spectrale de la lumière varie aussi selon la profondeur. On définit arbitrairement la profondeur de la couche euphotique comme étant la profondeur où la lumière n'a plus que 1% de l'intensité qu'elle a sous la

surface de l'eau. Alors que dans l'eau pure, la couche euphotique peut avoir plus de 100 m de profondeur, elle n'a souvent que 50 m d'épaisseur quand il y a du plancton. Il existe une intensité optimale d'éclairement au-delà de laquelle la production primaire est moins efficace.

Le comportement du phytoplancton vis à vis de la lumière varie selon les espèces. Certaines espèces disposent de membranes les protégeant de l'excès de lumière et peuvent donc vivre à proximité de la surface dans des couches qui sont parfois très pauvres en nitrates. D'autres disposent d'un rapport chlorophylle/carbone très élevé et sont donc très sensibles à la lumière. Elles vivent à plus de 100 m de profondeur, là où la concentration en nitrates est élevée.

❖ Les minéraux

Dans la majeure partie de l'océan, la croissance du plancton consomme les nitrates jusqu'à leur épuisement : on parle de zone oligotrophe. En fait cette consommation est approximativement proportionnelle à son abondance jusqu'à un seuil de saturation. Au delà de ce seuil, la consommation ne change plus, les nitrates apportés en surplus par les courants ne sont pas utilisés et peuvent être exportés par ces mêmes courants : on parle de zone eutrophe. Le niveau de saturation est variable car le système trophique n'est pas le même selon les régions de l'océan. Il peut être inférieur à $0,2 \mu\text{mol kg}^{-1}$ en zone oligotrophe et dépasser $10 \mu\text{mol kg}^{-1}$ en zone eutrophe. La production primaire peut être limitée par d'autres effets que l'abondance des nitrates, comme l'abondance des phosphates et du fer dissous (Falkowski et al., 1998).

Chez le phytoplancton, seule les procaryotes et en l'occurrence certaines cyanobactéries sont capables d'assimiler directement l'azote gazeux dissous (ce n'est pas une propriété des eucaryotes phytoplanctoniques). Les fixateurs d'azote ne subissent donc pas une limitation forte par manque de sels nutritifs azotés (à l'état dissous comme le nitrates) dans l'océan, la quantité d'azote gazeux dissous étant largement en excès dans l'océan. L'existence de cyanobactéries (comme *Trichodesmium* conforterait l'hypothèse de base admise par de nombreux géochimistes, à savoir que sur les longues échelles de temps, l'élément limitant essentiel de la production primaire est le phosphore et non l'azote (Falkowski et al., 1998). Cependant d'autres processus, tels que la dénitrification (en milieu appauvri en O_2 , des bactéries utilisent NO_3^- à la place de O_2 comme oxydant vis à vis des matières organiques, aboutissant à la formation de NO_2^- puis de N_2) interviennent dans le découplage des cycles de l'azote et du phosphore, et de nombreux scientifiques pensent que c'est en fait l'azote qui est l'élément limitant majeur de la production primaire. Le débat n'est pas clos et la réponse peut dépendre de l'échelle de temps considérée.

On a découvert récemment le rôle primordial du fer dans l'activité du phytoplancton (Falkowski et *al.*, 1998). Jusque vers 1990, on croyait que la photosynthèse marine s'effectuait de façon optimale dans les zones où nitrates et phosphates étaient présents, jusqu'à épuisement de ces sels. Pourtant dans de vastes régions (l'océan Pacifique équatorial et l'océan Antarctique), les nitrates sont abondants en surface mais l'activité biologique y est anormalement faible. L'hypothèse d'une limitation de la photosynthèse par le fer a été prouvée en ensemençant une surface de l'océan de quelques dizaines de kilomètres de côtés. La zone enrichie en fer a connu alors un intense développement photoplanctonique (Falkowski et *al.*, 1998). Depuis il est admis que le fer pouvait, dans certaines régions éloignées des continents (et donc d'apports éoliens riches en fer), limiter l'intensité de la production primaire.

La répartition verticale des deux facteurs (lumière et nutriments) permet d'expliquer l'abondance maximale de la chlorophylle à un niveau intermédiaire. En effet, la quantité de lumière disponible décroît de la surface vers le fond, alors que la quantité de nutriments décroît du fond vers la surface. Il peut donc exister très schématiquement un niveau de profondeur optimum, où la production de phytoplancton dispose à la fois de suffisamment de lumière et de nutriments (d'après Gérard Copin-Montégut).

❖ **L'abondance du zooplancton**

Le "brouillage" par le zooplancton est le troisième facteur limitant la production primaire. Il existe un grand nombre d'espèces de zooplancton, mais on retrouve les mêmes partout dans l'océan. Il y a une trentaine d'année on faisait l'hypothèse que la vitesse de division des micro-organismes dans les écosystèmes océaniques centraux était très faible, de l'ordre de la semaine ou du mois. Cette hypothèse était confortée par le fait que la biomasse (estimée par exemple par le contenu en chlorophylle) était très stable au cours du temps. Cependant avec la découverte du picoplancton, on s'est aperçu que le système était beaucoup plus dynamique qu'il n'y paraissait. En particulier, on a découvert l'ubiquité de minuscules prédateurs d'une taille de quelques microns qui ingéraient les algues picoplanctoniques aussi rapidement qu'elles étaient produites. Ce système prédateur-proie extrêmement sophistiqué est pratiquement toujours à l'équilibre et résulte en une biomasse quasi-constante. Cette parfaite adéquation entre production et consommation rend cependant extrêmement difficile la mesure de la productivité du phytoplancton. Peut-être faudrait il donc dans ce contexte plutôt raisonner en terme de flux d'exportation de la matière organique vers la colonne sédimentaire, seul réservoir vers lequel un résidu planctonique s'échappe.

➤ **Conclusions**

La partie superficielle de l'océan se caractérise par l'existence d'une activité photosynthétique (production primaire) sur une profondeur variable (fonction de la charge particulaire de la colonne d'eau, environ 100 m en océan ouvert) appelée couche euphotique. Cette production primaire dans la zone photique s'effectue à partir d'un carbone minéral présent en quantité illimitée dans le milieu marin. La limitation de cette production est vraisemblablement liée à la teneur en phosphore ou en nitrate et à la pénétration de la lumière. Ces apports nutritifs sont liés à la dynamique de l'océan. Elle contribue à la production d'une biomasse (carbone organique) et s'accompagne pour un certain nombre de groupes de producteurs primaires, pour la fabrication de leurs tests, d'une calcification ou bien encore d'une silicification.

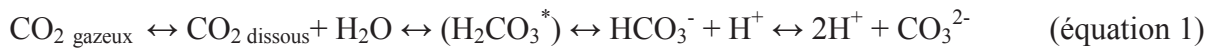
La fixation du carbone minéral dans les océans par les producteurs primaires joue un rôle clé dans le cycle global du carbone, mais qui est loin d'être totalement résolu aujourd'hui. L'importance respective de ces différentes communautés dans la contribution à la production de carbone organique et de CaCO_3 est donc cruciale. Jusqu'à présent, les cyanobactéries avaient été tenues pour principaux contributeurs à la fixation du carbone minéral dans les océans. La limitation des cyanobactéries se fait cependant par le broutage du zooplancton, mais aussi par leur attaque par des virus cyanophages qui les infectent. Cela est de plus en plus vérifié et ces virus semblent jouer un rôle important dans la limitation de leur prolifération en zones côtières notamment. Bien que moins abondante, une biomasse phytoplanctonique eucaryote pourrait avoir une implication aussi importante que celle des cyanobactéries (Jardillier et al, 2010).

2.1.2.2 Déséquilibre du système carbonate de l'eau de mer

Le carbone minéral de l'eau de mer est une source commune à la production de biomasse et à la calcification. L'entrée de CO_2 dans les eaux de surface par le biais des échanges entre l'océan et l'atmosphère interfèrent sur l'équilibre carbonate de l'eau de mer. Les activités de photosynthèse et de calcification interagissent également sur l'équilibre carbonate des eaux marines dans la zone photique. Les deux paramètres CID et TA dont les définitions seront données ci après permettent de rendre compte des modifications apporté au système carbonate de l'eau de mer.

➤ **Définitions du CID**

Le carbone dans l'eau se présente sous trois formes minérales dissoutes : dioxyde de carbone (CO_2), bicarbonate (HCO_3^-) et carbonate (CO_3^{2-}). Ces trois espèces constituent ce que l'on appelle communément le "système carbonate" et sont en équilibre selon les réactions suivantes :



(*) acide carbonique

La solubilité K_0 du dioxyde de carbone augmente quand la température diminue (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). Même à concentration constante de CO_2 dissous, la pression partielle de gaz dissous P_{CO_2} diminue proportionnellement à K_0 ($P_{\text{CO}_2} = [\text{CO}_2]/K_0$). Ceci se traduira par un flux de CO_2 de l'atmosphère vers l'océan. Par ailleurs, la solubilité du CO_2 diminue quand la salinité augmente (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001). En effet les gaz sont des molécules neutres dont l'insertion est rendue plus difficile par la présence des charges électriques portées par les ions présents dans l'eau de mer.

La répartition de ces espèces chimiques est régie par la loi d'action de masse :



(la concentration de l'eau étant constante, elle ne figure pas dans l'équation),

Contrairement aux vitesses de transfert gaz-liquide qui sont à l'échelle de l'heure ou de la journée, les cinétiques des réactions entre les espèces dissoutes sont à l'échelle du centième de seconde.

K_1 et K_2 sont les constantes de dissociation qui dépendent de la température et à un moindre degré de la salinité (la pression influe également mais son effet est très mal connu) (Zeebe and Wolf-Gladrow, 2001).

Toute modification de la concentration d'une de ces espèces chimiques déplace les équilibres et modifie l'abondance des autres formes. Les équilibres (1) et (2) sont déplacés vers la gauche et favorisent la concentration de l'espèce CO_2 aux valeurs basses de pH (excès de protons). A l'inverse aux valeurs élevées de pH, l'espèce CO_3^{2-} est favorisée (manque de protons).

Par exemple si la quantité de CO_2 dissous augmente, l'abondance de bicarbonate (HCO_3^-) augmente en même temps, tandis que celle du carbonate (CO_3^{2-}) diminue. Cela peut

s'écrire globalement avec la réaction d'équilibre suivante, (qui représente l'équation d'acidification de l'océan par introduction de CO₂)



Les rapports $[\text{CO}_2]/C_T$, $[\text{HCO}_3^-]/C_T$, $[\text{CO}_3^{2-}]/C_T$ ne dépendent que du pH. On définit C_T comme la somme du CID (pour carbone inorganique dissous) : $\sum [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{CO}_2 \text{ dissous}]$. On peut dégager à partir des équations précédentes 3 relations utiles :

$$[\text{CO}_{2aq}] = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+]^2 + K_1 \cdot [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2} C_T$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \frac{K_1 \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^2 + K_1 \cdot [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2} C_T$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \frac{K_1 \cdot K_2}{[\text{H}^+]^2 + K_1 \cdot [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2} C_T$$

Si ces expressions sont reportées dans un diagramme en fonction du pH, trois zones de dominance apparaissent (Figure 6).

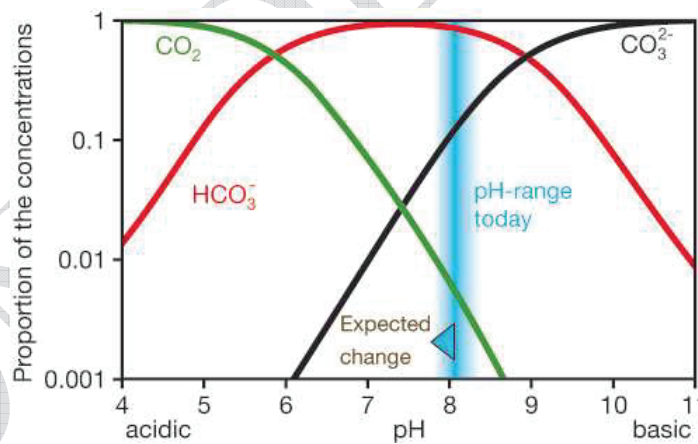


Figure 6 : Variation des rapports CO_2/C_T , HCO_3^-/C_T et CO_3^{2-}/C_T en fonction du pH dans une eau de salinité 35 et à 25°C sans échange avec l'atmosphère. Le domaine des pH habituels des eaux de mer (~7,5-8,5) est délimité par la zone de couleur bleu (Raven et al., 2005).

L'eau de mer, avec un pH de 7,5 à 8,6, est fortement dominée par les ions HCO_3^- . Avec une teneur voisine de 2 moles m^{-3} (125 fois plus que dans l'atmosphère à volume/volume), le carbone minéral de l'océan se répartit ainsi (DOE, 1994) :

$\text{HCO}_3^- =$	$1818 \mu\text{mol kg}^{-1},$	soit 86% du DIC,
$\text{CO}_3^{2-} =$	$272 \mu\text{mol kg}^{-1},$	soit 12.9% du DIC,
$\text{CO}_2 \text{ dissous} =$	$10,4 \mu\text{mol kg}^{-1},$	soit 0,5% DIC

On comprend pourquoi l'équilibre air-océan est si long à s'établir : il se fait par l'intermédiaire d'une espèce qui ne représente que 1 % du stock du carbone inorganique total des océans. L'agitation de la couche limite est également importante dans la cinétique de transfert.

➤ **Définition du titre alcalimétrique ou alcalinité totale**

Les deux espèces chimiques bicarbonate et carbonate associées au CO_2 dissous constituent le "système carbonate". Outre le pH, une caractéristique essentielle du système carbonate est l'**alcalinité**. C'est une grandeur mesurable qui ne dépend pas du pH. Son grand mérite est de représenter, en quelque sorte, la résistance chimique de l'eau vis-à-vis d'une perturbation acido-basique via le maintien de la neutralité électrique de l'eau (on parle de "pouvoir tampon").

L'alcalinité totale est désignée sous le sigle **TA**. L'alcalinité est exprimée par la balance (ou déséquilibre) des charges de la solution (en $\mu\text{mol kg}^{-1}$). On peut l'écrire : $\text{TA} = \sum [\text{cations}] - \sum [\text{anions}]$. Elle est décrite par l'équation complète suivante :

$$\text{TA} = [\text{Na}^+] + 2[\text{Mg}^{2+}] + 2[\text{Ca}^{2+}] + [\text{K}^+] + [\dots] + [\text{H}^+] - [\text{Cl}^-] - 2[\text{SO}_4^{2-}] - [\text{NO}_3^-] - [\text{HCO}_3^-] - 2[\text{CO}_3^{2-}] - [\text{BOH}_4^-] - [\text{OH}^-] - [\dots]$$

que l'on peut simplifier en

$$\text{TA} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{BOH}_4^-] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+] \pm \text{composés mineurs.}$$

On utilise cependant des expressions simplifiées de l'alcalinité comme l'**alcalinité pratique** désignée sous le sigle **PA** en négligeant les composés mineurs, et qui est définie comme suit :

$$\text{PA} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{BOH}_4^-] + [\text{OH}^-] + [\text{H}^+] \approx \text{TA}$$

On définit également une alcalinité carbonate désignée sous le sigle **CA** et définie comme suit :

$$\text{CA} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}]$$

Dans l'eau de mer, l'alcalinité carbonate (CA) contribue pour environ 90 % de l'alcalinité totale (TA). Globalement, c'est l'évolution du rapport entre les deux espèces carbonatées qui permet de maintenir la neutralité électrique de la solution.

➤ **Évolutions du TA dans les systèmes carbonates**

Les changements d'alcalinité (dans les océans) ne peuvent être liés qu'à :

- des modifications de la salinité, qui peuvent être dues à de la précipitation, de l'évaporation, de l'entrée d'eau fraîche, de la formation ou de la fonte de glace de mer,
- la précipitation biogénique de carbonate de calcium par des organismes marins, comme les coccolithophores, les foraminifères, les ptéropodes et les coraux,
- la dissolution des squelettes carbonatés.

L'entrée ou la sortie de CO_2 dans l'océan ne change pas l'alcalinité totale. De la même manière la photosynthèse, dès lors qu'il n'y a pas de production de carbonate de calcium (pour faire une coquille), ne modifie pas non plus l'alcalinité totale.

❖ **Diminution de TA par production de carbonate de calcium**

Lors de la fabrication du test (ou de la coquille) la précipitation d'une mole de carbonate de calcium se traduit par une diminution d'une mole de carbonate dissous, c'est à dire de 1 mole de DIC et donc de 2 moles de TA. Il faut remarquer que ces variations à la fois de DIC et de TA sont indépendantes de l'espèce minérale (HCO_3^- ; CO_3^{2-} ; CO_2 dissous) utilisée par les microorganismes, et qu'en conséquence la nature de la source de carbone ne peut être déduite de la mesure de DIC et de TA.

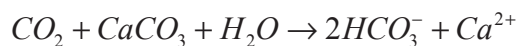
On néglige souvent les variations de TA relatives à l'assimilation de la source d'azote et à la production de composés azotés inorganiques solubles liée à la respiration des composés organiques. On considère que la consommation de 1 NO_3^- est contrebalancé par 1 OH^- (ce qui génère une augmentation de TA), que la consommation de 1 NH_4^+ est contrebalancé par 1 H^+ (ce qui génère une diminution de TA), et qu'il n'y a pas de changement de TA avec l'utilisation de l'urée.

Une précipitation spontanée de CaCO_3 à partir de l'eau de mer ne s'opère pas malgré les conditions de sursaturation. La formation des carbonates de calcium est essentiellement biologique.

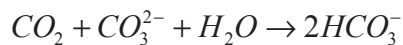
❖ **Augmentation de TA par dissolution du carbonate de calcium**

La dissolution du carbonate de calcium (dissolution des squelettes carbonatés) incluant la magnésite (à partir des coraux), l'aragonite (à partir des coraux et des ptéropodes), et la calcite (à partir des coccolithophoridés, et des foraminifères) participe à l'augmentation de l'alcalinité totale (TA) de l'eau, par libération de Ca^{2+} (augmentation de la somme des cations/la somme des anions).

La dissolution de carbonate de calcium et tous autres processus qui vont concourir à l'augmentation de l'alcalinité totale vont permettre une augmentation de la dissolution du CO_2 à partir de l'atmosphère selon l'équation suivante :



NB : Cette réaction est assez proche de la réaction que l'on écrit dans le cadre de l'acidification des océans par le biais de l'incorporation de CO_2 .



❖ Effets antagonistes de la photosynthèse et de la calcification sur la captation du CO_2 et sur l'alcalinité des océans

La photosynthèse provoque une diminution du carbone inorganique total (C_T) dans l'eau. En absence d'une calcification biologique associée, la photosynthèse ne modifie pas le TA, mais a pour effet de diminuer l'abondance des ions bicarbonate et d'augmenter l'abondance des ions carbonate. Cette stricte activité de photosynthèse a donc tendance à s'accompagner d'une diminution de la pression partielle de gaz dissous (réaction du CO_2 dissous avec le carbonate) les eaux de surface auront donc tendance à absorber du CO_2 . Si la production primaire concourt à une consommation de bicarbonate, il faut également prendre en compte le processus de calcification développé par de nombreux microorganismes (coccolithophoridés, etc.) au sein de cette population de producteurs primaires (les organismes à test siliceux n'interférant pas au titre strict de la calcification dans cet équilibre carbonaté). Cette précipitation de $CaCO_3$ se traduit par une diminution de l'espèce carbonate dans l'eau et donc par une capacité de piégeage plus faible du système carbonate, ce qui va donc à l'encontre d'une entrée de CO_2 dans le milieu.

Les effets de la photosynthèse et de la calcification sont donc antagonistes sur la P_{CO_2} . L'effet net dépend de l'importance relative des deux processus. Ainsi les diatomées (principaux producteurs primaires phytoplanctoniques à squelette siliceux) sont toujours des puits (à l'échelle des échanges au niveau des eaux de surface) de CO_2 . A l'inverse, les

coccolithophoridés pourraient devenir des sources de CO_2 à partir d'un rapport g de 0,6 ($\text{Ci} / (\text{Corg} + \text{Ci})$). Le rôle des organismes dépend de leur rapport g ($\text{Ci} / (\text{Corg} + \text{Ci})$) mais également des paramètres qui contrôlent ce facteur, comme la P_{CO_2} atmosphérique qui n'est donc pas constante en fonction des conditions climatiques.

2.1.2.3 Acidification des océans et impact sur le puits de CO_2

➤ *Cycle photosynthèse-minéralisation de la biomasse phytoplanctonique*

L'énorme quantité de biomasse produite par l'activité de photosynthèse dans la zone photique est rapidement dégradée (voir Figure 7). D'une part les microorganismes phytoplanctoniques sont rapidement consommés par le zooplancton (broutage). D'autre part ce phytoplancton est rapidement re-minéralisé. La matière organique produite par photosynthèse finit en effet par être en très grande partie oxydée et transformée en substances minérales dissoutes dans l'océan. Cette matière organique minéralisée en surface par l'activité des bactéries et du zooplancton va donc alimenter "en circuit fermé" la partie de la production primaire appelée production régénérée. Celle-ci est donc entretenue par des nutriments produits directement dans la couche euphotique par le biais de la décomposition assez poussée de certaines molécules complexes existant dans les organismes. Le carbone organique dissous (COD) à l'origine de cette production primaire régénérée se présente sous une forme "labile" facilement décomposée par l'activité bactérienne (sur des constances de temps de quelques jours). Le carbone transitant par ce circuit est isolé peu de temps de l'atmosphère.

D'autre part le phytoplancton à sa mort peut également être sédimenté vers les profondeurs de l'Océan. Les premiers contributeurs de cette sédimentation sont les coquilles carbonatées qui sont produites dans la zone eutrophique. Lors de la sédimentation et de la dégradation associée (minéralisation) de cette matière organique, une fraction désignée sous le terme de fraction "réfractaire" (20% du C organique dissous) sera difficile à minéraliser rapidement et donc à recycler dans les zones peu profondes de l'océan. La forme réfractaire du carbone organique dissous (COD) et le carbone organique particulaire (COP, sous forme de pelotes fécales et de cadavres) peuvent être exportés vers l'océan profond lors de la convection hivernale. Ils représentent la production exportée (de l'ordre de quelques % de la production primaire) . Mais la quasi-totalité de celle-ci est peu à peu ré-oxydée en sels dissous au cours son transfert. En régime stationnaire, ce flux vertical descendant est équilibré par un flux vertical ascendant. Les sels dissous formés dans l'océan intermédiaire et profond vont réalimenter l'océan de surface pour fermer le circuit en participant à la production primaire.

Cette partie de la production qui résulte de l'apport de nutriments profonds est appelée production nouvelle.

Contrairement aux aires continentales, le cycle du carbone dans l'océan, associant la photosynthèse et la respiration est très rapide. En conséquence l'activité photosynthétique liée à cette production primaire impacte peu le cycle du carbone.

Cependant une infime partie du carbone résiduel provenant de cette activité de photosynthèse (phytoplancton qui atteint le sédiment), peut être piégée à très long terme (moins de 1%) essentiellement sous forme de CaCO_3 . Néanmoins le puits de carbone associé à ce mécanisme de fossilisation est important lorsque l'on considère ce phénomène sur de longues périodes de temps.

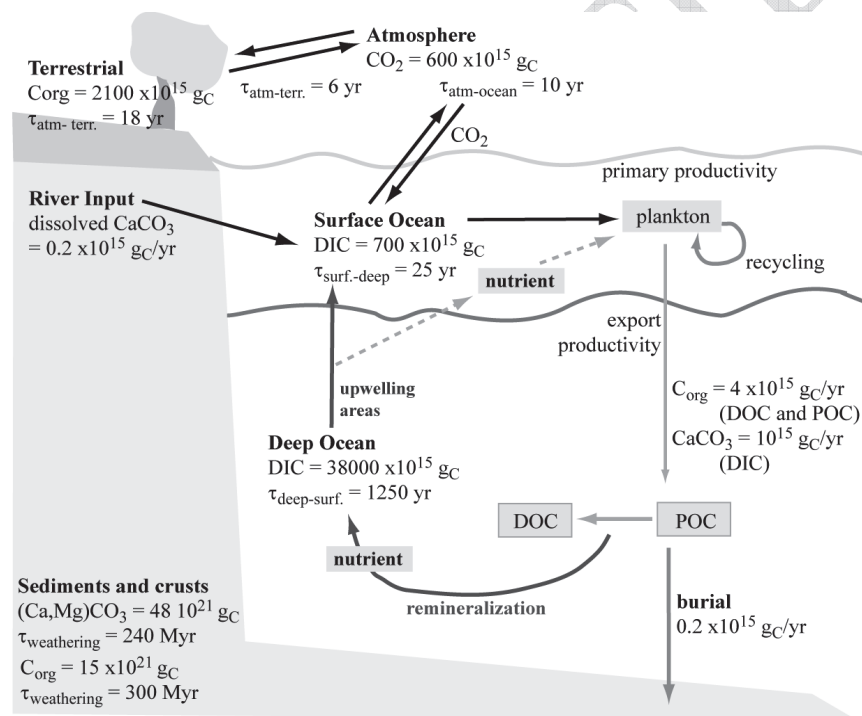


Figure 7 : Cycle naturel du carbone (d'après Holmen, 1992; Siegenthaler and Sarmiento, 1993; Sigman and Boyle, 2000). Influence de la pompe biologique et des remontées d'eaux profondes sur le cycle océanique du carbone.

➤ ***Acidification des Océans : modification des horizons calcite et aragonite – influence sur la pluie de carbonate de calcium.***

Une partie de la matière minérale et organique produite par l'activité de photosynthèse sédimente dans la colonne d'eau sous le poids des tests. Cette fraction est donc soustraite à un recyclage rapide dans la zone superficielle des océans. Cette pluie continue (COP et COD) depuis la surface vers l'océan profond (production exportée), qui fonctionne avec la mort des

organismes vivants (restes organiques et minéraux, phytoplancton, zooplancton, pelotes fécales), contribue à la différence de contenu en carbone inorganique (DIC) entre l'océan superficiel, plus pauvre, et l'océan profond, plus riche. Ce phénomène est connu sous le nom de "pompe biologique à CO₂". Il contribue à l'augmentation de la teneur en "CO₂" des couches intermédiaires et profondes de l'océan par dissolution des structures calcifiées et dégradation de la matière organique libérant du CO₂, qui réagit sur l'équilibre carbonate (Falkowski et al, 2000). Cette pompe biologique permet de maintenir en permanence un enrichissement de l'ordre de 10 % de la teneur en "CO₂" (sous la forme de bicarbonate) des eaux profondes (DIC ≈ + 220 μmol.kg⁻¹) par comparaison avec les eaux de surface (DIC ≈ 2.100 μmol.kg⁻¹).

La calcification biologique en surface diminue les concentrations en carbonate (CO₃²⁻) (**pompe à carbonates**). Les eaux profondes acides (par la présence du CO₂ issu de la reminéralisation de la biomasse exportée) contribuent à dissoudre le CaCO₃ associé à cette exportation. En conséquence, l'alcalinité totale des eaux de surface est de l'ordre de 50 à 150 μmol kg⁻¹ inférieure à celle des eaux profondes (Feely et al., 2004).

❖ Impact de l'acidification sur les horizons calcite et aragonite

L'augmentation des concentrations de CO₂ atmosphérique mesurée au cours de ces deux derniers siècles (Feely et al., 2004) a conduit à une assimilation importante de CO₂ par les océans entraînant un processus d'acidification des eaux de surface. Par ailleurs, on vient de voir que la pompe biologique contribue à un enrichissement de l'ordre de 10 % de la teneur en CO₂ (sous la forme de bicarbonates) des eaux profondes. En conséquence, dans les eaux profondes, non seulement la concentration de C_i totale augmente, mais la concentration de l'espèce carbonate diminue. Cette modification de la distribution des deux espèces carbonate et bicarbonate en allant de la surface vers la profondeur des océans a une répercussion sur les horizons calcite et aragonite.

Rappel de la notion d'horizons calcite et aragonite

L'état de saturation du CaCO₃ dans les océans est un paramètre important. Il est défini ainsi :

$$\text{Saturation calcite } \Omega_{\text{cal}} = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]/K_{\text{sp calcite}}^*$$

$$\text{Saturation aragonite } \Omega_{\text{arg}} = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]/K_{\text{sp aragonite}}^*$$

Par convention, quand le degré de saturation Ω est >1 pour le minéral en question (aragonite ou calcite), l'eau de mer est considérée comme saturée et la calcite ou l'aragonite

sont préservées d'un processus de dissolution. La situation est inverse lorsque le degré de saturation Ω est <1 . Le rapport de la concentration du calcium à la salinité ne varie pas plus de 1,5 % quelle que soit la profondeur dans l'océan. En conséquence les variations de concentration de l'espèce carbonate sur la profondeur gouverne le degré de saturation de la calcite ou de l'aragonite. Les horizons calcites et aragonite représentent les profondeurs respectives pour la calcite et l'aragonite pour lesquelles il y a égalité ($\Omega =1$) entre les concentration en CO_3^{2-} mesurées et la concentration de saturation $[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{sat}}$ déterminée en fonction de la profondeur.

NB : Le carbonate de calcium peut être considéré comme un sel inhabituel. En effet sa solubilité dans l'eau augmente à basse température. Cependant cet effet reste faible, sa solubilité augmente avec la pression. Si l'on considère une température moyenne et homogène sur toute la profondeur de la colonne d'eau, on peut simplifier en disant que la solubilité du CaCO_3 augmente avec la profondeur, d'où la modification de la valeur de K_{sp} avec la profondeur, d'où le profil théorique représentant les concentrations de saturation $[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{sat}}$ déterminées en fonction de la profondeur. Les profondeurs auxquelles se situent les horizons calcite ou aragonite sont obtenues par le croisement des deux courbes de concentration réelle et de saturation $[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{sat}}$ de l'espèce carbonate.

Des cartographies détaillant les horizons calcite et aragonite ont été obtenus pour l'ensemble des grands océans de la planète (Atlantique, Pacifique et Indien). Les horizons calcite sont significativement plus profonds que les horizons aragonite parce que la calcite est moins soluble dans l'eau que l'aragonite. D'une manière générale, les horizons calcite et aragonite ont tendance à remonter dans les trois grands océans (Feely et al., 2004), et les zones d'insaturation pour l'aragonite apparaissent fortement en expansion (cf. Figure 8). Si cette tendance se confirme dans le futur, on peut projeter que les zones de sous-saturation en aragonite vont être soumises à une encore plus forte expansion. Cette situation va intervenir plus facilement dans les zones océanes froides ($p\text{CO}_2$ plus élevée à cause de la température faible et des meilleurs transferts de CO_2 liés à l'agitation : vent, tempête en surface de l'eau⁷). Ces régions sous-saturées montrent également des accumulations de CO_2 pouvant aller à des valeurs de 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$.

⁷ Le CO_2 est le constituant gazeux de l'atmosphère le plus soluble dans l'eau et sa solubilité croît lorsque la température diminue. L'eau de mer de surface, à salinité normale, devrait – toutes conditions égales par ailleurs – dissoudre environ 0,25 ml/l de CO_2 à 25°C, et deux fois plus à 0°C. Par ailleurs, la solubilité du CO_2 augmente avec la pression, et diminue avec la salinité.

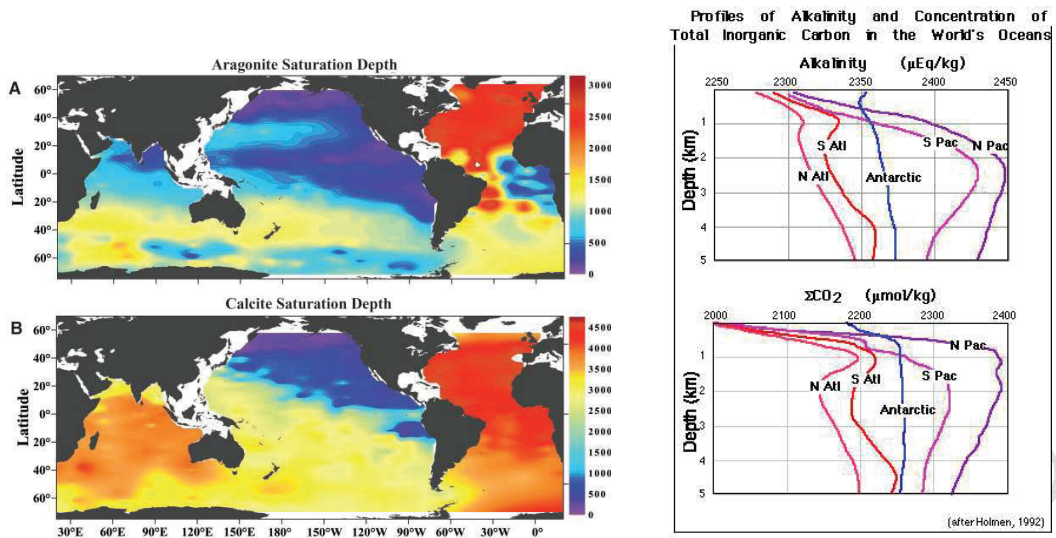


Figure 8 : Distribution des saturations en calcite et en aragonite ($\Omega_{\text{minéral}} = 1$). Quand le degré de saturation $\Omega_{\text{minéral}} > 1$, l'eau de mer est sursaturé pour l'espèce minérale considérée, et inversement quand $\Omega_{\text{minéral}} < 1$). (Feely et al., 2004; Holmen, 1992)

❖ Impact des horizons calcite et aragonite sur le puits de carbone

Les cartographies pour les horizons calcite et aragonite ont donc un intérêt considérable pour comprendre la préservation du carbonate de calcium au cours de la sédimentation (ou pluie de carbone). Jusqu'à très récemment il était admis que la dissolution du carbonate de calcium d'origine pélagique intervenait à grande profondeur en dessous de l'horizon de saturation de la calcite. Cependant des analyses récentes sur le budget global du carbone et des carbonates dans les océans indiquent que de l'ordre de 60 à 80 % du carbonate de calcium exporté à partir de la surface est dissous dans les premiers 1.000 mètres (Feely et al., 2004).

La production moyenne (par voie biologique) de CaCO_3 est estimée à 0,8 à 1,4 Pg de CaCO_3 - (C) par an. Le taux de dissolution moyen du CaCO_3 pour les trois océans est estimé à $0,55 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{an}^{-1}$ de CaCO_3 ⁸ (cf. Figure 9, partie gauche). Les quantités moyennes de

⁸ Note sur la dissolution du carbonate de calcium : La quantité de carbonate de calcium qui est dissoute à la surface d'une parcelle d'eau est estimée par les changements dans l'alcalinité totale, en soustrayant la valeur de TA préformée et en corrigeant de la valeur de diminution de TA liée au relargage de protons au cours de l'oxydation de la matière organique, selon l'équation : $\Delta \text{CaCO}_3 (\mu\text{mol.kg}^{-1}) = 0,5 \times (\text{T}_{\text{AMEAS}} - \text{TA}^\circ) + 0,63 (0,0941 \times \text{AOU})$

où T_{AMEAS} est la valeur mesurée de TA, TA° est la valeur de TA préformée, et AOU est la valeur d'utilisation apparente d'oxygène.

Le second terme de l'équation intervient pour la décroissance de la valeur de TA résultant de l'oxydation de la matière organique en utilisant AOU : $\text{AOU} = [\text{O}_2 (\text{valeur de saturation pour une température et une salinité donnée}) - \text{O}_2 (\text{mesurée})]$, $0,0941 = \text{N}/\text{O}_2$ et $0,63$ est utilisé pour tenir compte de la contribution au TA de l'oxydation des composés organiques avec N, P et S.

carbonate dissous sont estimés autour de $0,5 \pm 0,2 \text{ Pg}^9$ de CaCO_3 (équivalent C par an), soit approximativement 45 à 65% de la production exportée de CaCO_3 (Feely et al., 2004).

Des données existent dans la littérature sur la fraction "carbone minéral" (carbonate de calcium) qui est piégée (cf. Figure 9, partie gauche). Elle est faible, de l'ordre de 0,4 à 0,5 Pg par an, au regard des flux très importants d'échange entre l'atmosphère et l'océan qui sont estimés à environ 90 Gt/an.

Une augmentation de la dissolution du CaCO_3 , dans les premiers 1.000 m de la colonne d'eau, devrait tendre vers une augmentation de l'alcalinité et conduire à un profil d'alcalinité plus uniforme de la surface vers la profondeur, sinon à un glissement du gradient actuel vers des valeurs plus élevées de TA. Ce redressement du profil de concentration des carbonates ne ferait qu'accélérer le processus de dissolution des carbonates de calcium.

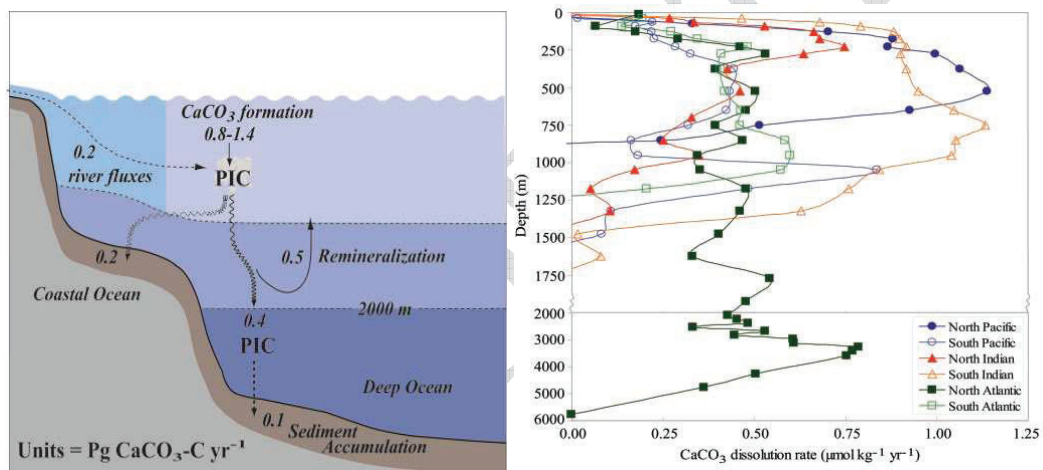


Figure 9 : (gauche) budget CaCO_3 dans l'océan. Les valeurs sont données en Pg de $\text{CaCO}_3\text{-C}\text{.an}^{-1}$; (droite) taux de dissolution dans les trois océans ($\mu\text{mol CaCO}_3\text{.kg}^{-1}\text{.an}^{-1}$). (Feely et al., 2004)

Le TA° est estimé pour chaque océan en utilisant une régression linéaire multi paramètres utilisant des traceurs conservatifs, comme la salinité ou NO et PO.

Pour estimer la vitesse de dissolution du CaCO_3 dans les eaux, lorsque la valeur de ΔCaCO_3 est positive, ΔCaCO_3 est tracé par rapport à l'âge de l'eau examinée. L'âge de l'eau, fonction de la profondeur, est évalué par en faisant appel à des mesures de chlorofluorocarbones [(CFC-11) ou (CFC-12)] pour les eaux de surfaces et à partir de delta 14C pour les eaux profondes où les CFC ne sont pas détectés.

9 Unités : Pg = pétagramme = 10¹⁵ grammes = 1 Gt.

2.1.2.4 Cycle du carbone et Climat - Conclusions

Le cycle du carbone est lié de près au climat :

- d'une part, l'assimilation du CO_2 par les océans régule l'accumulation des gaz à effets de serre dans l'atmosphère pouvant avoir ainsi une influence sur les changements climatiques,
- d'autre part, l'assimilation du CO_2 par les océans est à son tour affecté par les changements climatiques, au travers de changements dans les processus biogéochimiques et physiques de l'océan (Lo Monaco et *al.*, 2005). Par exemple l'augmentation globale de la température du globe conduit à un réchauffement moyen des eaux, avec comme conséquence un ralentissement de la capacité des océans à piéger le CO_2 (par simple processus physique lié à la solubilité du CO_2 avec la température).

A l'échelle de la planète, l'activité de photosynthèse représente la production primaire. Quand elle se déroule dans un milieu aquatique, elle concourt à consommer du bicarbonate et implique pour partie une activité de calcification (consommant du carbonate pour la fabrication des tests). Elle semble utiliser quatre fois plus de carbone pour fabriquer de la matière organique que pour ses squelettes. Dans ces conditions le bilan net de ces deux activités biologiques devrait se traduire par une augmentation de la concentration en carbonate. En conséquence les équilibres CO_2 /bicarbonate/carbonate devraient avoir tendance à se déplacer vers la droite (équation 1). Globalement cela va dans le sens d'une diminution de la P_{CO_2} favorisant les entrées de CO_2 venant de l'atmosphère. En fait, localement cet effet n'est pas toujours observé. Il est même parfois inversé du fait de l'importance relative du processus d'acidification (transfert forcé du CO_2 atmosphérique vers les couches superficielles de l'océan) par rapport au processus d'alcalinisation apporté par l'activité globale de photosynthèse + calcification.

Cette acidification des eaux superficielles des océans peut avoir trois conséquences :

- modifier l'équilibre des populations des microorganismes photosynthétiques et donc leurs poids respectif dans le cycle du carbone,
- modifier le rapport " $\text{C}_{\text{org}} / \text{CaCO}_3$ " au niveau de la sédimentation
- influencer la préservation du CaCO_3 (puits de carbone).

Le premier point concerne la physiologie des microorganismes qu'ils soient munis de tests ou non. Le poids respectif de ces populations pourrait être modifié en fonction des évolutions de l'équilibre carbonate de l'eau de mer dans ces eaux superficielles. Dans les eaux de surface légèrement acidifiées, du fait que le CO_2 réagit avec les carbonates selon la réaction : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^-$ l'hypothèse est avancée qu'il pourrait être plus difficile de précipiter du CaCO_3 pour faire le test de ces organismes à coquilles. Cette question fait l'objet de nombreux travaux. Un arrêt de la production de carbonate de calcium par les microorganismes diminuerait la $p\text{CO}_2$ dans l'eau de surface de l'ordre de 10 à 20 μatm (Gruber et al., 2004).

Le second point est intrinsèquement lié au premier. En effet, une modification des équilibres dans les populations de producteurs primaires peut affecter la proportion relative entre la production de carbone organique sous forme de biomasse (C_{org}) et celle de carbone minéral sous forme de carbonate ($\text{C}_{\text{minéral}}$). Une décroissance du processus de carbonatation (fabrication de tests) pourrait par ailleurs affecter le processus même d'exportation du carbone (biologique et minéral) vers les couches plus profondes de l'océan, pour lequel le rôle de ballastage est essentiel.

La question du couplage des pluies de carbone organique et minéral est aussi au cœur de ce problème de puits de carbone. Si les processus régulant les pluies de carbone inorganique et organique dans les sédiments sont découplés, alors une décroissance de la production de CaCO_3 conduira à une augmentation du pH des eaux en surface, mais aussi à une augmentation de la dissolution des sédiments carbonatés produits (en relation avec une diminution de la vitesse de sédimentation). Si à l'inverse, les deux processus sont couplés comme par le ballastage de la matière organique par les coques carbonatées, alors la réduction de la production de carbonate de calcium pourrait conduire à une re-minéralisation qui va s'opérer dans des couches moins profondes, diminuant encore l'importance de l'exportation de carbone (Feely et al., 2004).

Dans une optique de séquestration du CO_2 (puits de carbone), il apparaît crucial de progresser dans la connaissance de ce rapport " $\text{C}_{\text{org}} / \text{CaCO}_3$ " et du couplage des pluies de carbone organique et minéral pour mieux prévoir leur incidence sur le processus de dissolution du carbonate de calcium (lié aux horizons calcite et aragonite) et au final sur le puits de carbone (piégeage à long terme de CaCO_3). C'est l'objet du troisième point de cette conclusion. La remontée actuellement constatée des horizons calcite et aragonite a pour conséquence une augmentation de la dissolution du CaCO_3 dans la tranche superficielle des

océans. Des chiffres de 60 à 80 % de dissolution actuelle du CaCO₃ dans les premiers mille mètres de l'océan sont avancés (Feely et *al.*, 2004).

2.1.3 Bibliographie

Anderson, T.F., Arthur, M.A., 1983. Stable isotopes of oxygen and carbon and their application to sedimentologic and paleoenvironment problems, in: ARTHUR, M.A., ANDERSON, T.F., KAPLAN, I.R., VEIZER, J., LAND, L.S. (Eds.), *Stable Isotopes in Sedimentary Geology*. SEPM short courses, Columbia, pp. 1-151.

Bellec, L., Grimsley, N., Moreau, H., Desdevises, Y., 2009. Phylogenetic analysis of new Prasinoviruses (Phycodnaviridae) that infect the green unicellular algae *Ostreococcus*, *Bathycoccus* and *Micromonas*. *Environmental Microbiology Reports* 1, 114-123.

Berner, R.A., Kothavala, Z., 2001. Geocarb III: A Revised Model of Atmospheric CO₂ over Phanerozoic Time. *American Journal of Science* 301, 182-204.

Berner, R.A., Lasaga, A.C., Garrels, R.M., 1983. The carbonate-silicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *American Journal of Science* 283, 641-683.

Brady, P.V., Carroll, S.A., 1994. Direct effects of CO₂ and temperature on silicate weathering: Possible implications for climate control. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 1853-1856.

Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B., Welschmeyer, N.A., 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334, 340-343.

Coffin, M.F., Eldholm, O., 1992. *Volcanism and continental break-up: a global compilation of large igneous provinces*. Geological Society, London, Special Publications 68, 17-30.

Copin-Montégut., G., *Physique et chimie de l'eau de mer*. Disponible sur : <http://www.obs-vlfr.fr/menu-enseignement.php>.

Courties, C., Perasso, R., Chrétiennot-Dinet, M.J., Gouy, M., Guillou, L., Troussellier, M., 1998. Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 34, 844-849.

DeLong, E.F., 2005. Microbial community genomics in the ocean. *Nature Reviews Microbiology* 3, 459-469.

Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynié, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C.,

Panaud, O., Piégu, B., Ball, S.G., Ral, J.-P., Bouget, F.-Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., Moreau, H., 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11647-11652.

Diez, B., Pedros-Alio, C., Massana, R., 2001. Study of Genetic Diversity of Eukaryotic Picoplankton in Different Oceanic Regions by Small-Subunit rRNA Gene Cloning and Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2932-2941.

DOE, 1994. Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water., in: Dickson, A.G., Goyet, C. (Eds.), ORNL/CDIAC-74.

Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Hogberg, P., Linder, S., Mackenzie, F.T., Moore, B., III, Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V., Steffen, W., 2000. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science* 290, 291-296.

Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200-206.

Feely, R.A., Sabine, C.L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V.J., Millero, F.J., 2004. Impact of Anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ System in the Oceans. *Science* 305, 362-366.

Gaillardet, J., 2006. L'eau, le CO₂ et le climat de la Terre, in: Rotaru, M., Gaillardet, J., Steinberg, M., Trichet, J. (Eds.), *Les climats passés de la Terre*. Vuibert, Paris, pp. 95-142.

GIEC, 2007. Bilan 2007 des changements climatiques, p. 103.

Hedges, J.I., Keil, R.G., 1995. Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. *Marine Chemistry* 49, 81-115.

Holmen, K.J., 1992. The global carbon cycle, in: Butcher, S.S., Charlson, R.J., Orians, G.H., Wolfe, G.V. (Eds.), *Global biogeochemical cycles*. Academic Press, London, U. K., pp. 239-262.

Jardillier, L., Zubkov, M.V., Pearman, J., Scanlan, D.J., 2010. Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *The ISME Journal*, 15 April 2010; doi:2010.1038/ismej.2010.2036.

Javoy, M., 1998. The birth of the Earth's atmosphere: the behaviour and fate of its major elements. *Chemical Geology* 147, 11-25.

Javoy, M., Pineau, F., Allegre, C.J., 1982. Carbon geodynamic cycle. *Nature* 300, 171-173.

Keppeler, H., Wiedenbeck, M., Shcheka, S.S., 2003. Carbon solubility in olivine and the mode of carbon storage in the Earth's mantle. *Nature* 424, 414-416.

Lebaron, P., Nicolas, J.-C., 2003. Le virioplancton : des virus essentiels au bon fonctionnement de l'océan et au maintien de la biodiversité., *Virologie*, pp. 125-139.

Lo Monaco, C., Goyet, C., Metzl, N., Poisson, A., Touratier, F., 2005. Distribution and inventory of anthropogenic CO₂ in the Southern Ocean: Comparison of three data-based methods. *Journal of Geophysical Research* 110, C09S02.

Pace, N.R., 1997. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* 276, 734-740.

Palenik, B., Brahmsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E.E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E.A., Waterbury, J., 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424, 1037-1042.

Prieur, A., Combarous, M., 2003. Forêts et cycles de vie : aspects energetiques, produits, carbone stocke, Congrès Forestier Mondial, Quebec, 21-28 septembre 2003.

Raven, J. et al., 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Policy Document 12/05., The Royal Society, London.

Redfield, A.C., 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* 46, 205-221.

Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, A.F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S.L., Steglich, C., Sullivan, M.B., Ting, C.S., Tolonen, A., Webb, E.A., Zinser, E.R., Chisholm, S.W., 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424, 1042-1047.

Siegenthaler, U., Sarmiento, J.L., 1993. Atmospheric carbon dioxide and the ocean. *Nature* 365, 119-125.

Sigman, D.M., Boyle, E.A., 2000. Glacial/interglacial variations in atmospheric carbon dioxide. *Nature* 407, 859-869.

Stockner, J.G., 1988. Phototrophic Picoplankton: An Overview from Marine and Freshwater Ecosystems. *Limnology and Oceanography* 33, 765-775

Zeebe, R.E., Wolf-Gladrow, D.A., 2001. CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

2.2 Photosynthesis and Calcification in aquatic environments: a review about the role and the behaviour of Cyanobacteria and Coccolithophores

Denis Blanchet^{1*}, Lun Li^{1,2}, Philippe Oger^{3,4,5}, Gilles Dromart^{3,4,5} and Frank Haeseler¹

¹Institut Français du Pétrole Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois Préau, 92852 Rueil Malmaison, France; ²Ecole Doctorale Matériaux de Lyon, France ³Université de Lyon, France; ⁴CNRS, UMR5570, Laboratoire de Sciences de la Terre, 15 parvis René Descartes BP 7000, Lyon, F-69 342, France; ⁵ENS de Lyon, France;

Corresponding author, E-mail: denis.blanchet@ifpenergiesnouvelles.fr; Fax: +33 1 47 52 70 58; Tel: +33 1 47 52 66 89

Abstract

The objective of this review is to synthesize the present knowledge of the photosynthetic physiology of two organisms considered to be among the main players of oceanic primary production: cyanobacteria and coccolithophores. Furthermore, these two organisms represent interesting examples of calcifying phytoplankton groups with a completely different manner of using calcium: cyanobacteria are responsible for non-structured calcite and coccolithophorides for obligate synthesized calcite tests.

Biological calcification, whether induced as a by-product of biological activity (as in cyanobacteria) or highly controlled (i.e. formation of an exo-skeleton as in coccolithophores), is necessarily linked to cellular metabolism. The difference in the carbon uptake strategy developed by these two primary producers will be discussed, as well as the potential environmental triggering mechanisms of microbial calcification.

Finally, the acidification of oceans and the effect of climate change with the ongoing increase in atmospheric CO₂ concentration will be re-examined, especially with regard to the possible impact on microorganisms with calcareous tests for which a “grim future” was predicted.

The global carbon cycle in the Oceans

The carbon fixation by phytoplankton in the oceans plays a key role in the global carbon cycle. Nevertheless, all parameters controlling the primary production and its behaviour in the water column are not fully understood.

Phytoplankton are the primary producers of the oceans, consisting of nearly half of the total photosynthesis activity on the planet, while the remainder of the global production comes from terrestrial sources. This total primary production (photoautotrophic) in the ocean was estimated to be around 45-50 Gt C yr⁻¹ (Falkowski et al., 1998). This carbon flux is driven by a phytoplankton biomass of ≈ 1 Pg C, which suggests a very fast C turnover resulting in dynamic organic carbon fluxes. This phytoplankton biomass represents only 0.2% of the photosynthetically active C biomass on Earth (Field et al., 1998).

Phytoplankton and primary production

The primary production is performed by microscopic organisms called phytoplankton¹. Phytoplankton are autotrophic prokaryotic or eukaryotic algae that form the base of the food chain in the oceans. They live in the top 30-meter layer of the sea called the euphotic zone (where light can penetrate into the seawater), where they can use the energy of the sunlight to grow. Phytoplankton in today's oceans consist mostly of Cyanobacteria, Diatoms, Dinoflagellates and Coccolithophores. They include photoautotrophs from a variety of groups of organisms, prokaryotic bacteria (both eubacteria and archaea) and three eukaryote categories: green, brown and red algae. Photosynthetic phytoplankton vary in size between large ($> 2-5 \mu\text{m}$) and small ($< 2\mu\text{m}$). The phytoplankton biomass accounts for less than 1% of the total biomass living freely in the open sea.

Cyanobacteria (also called blue-green algae) in the genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus* are picophytoplankton (the smallest phytoplankton). Like all bacteria, cyanobacteria are prokaryotes, which can be distinguished from eukaryotes by the absence of a cell nucleus and mitochondrion. In the case of photosynthetic organisms, prokaryotes are also distinguished from eukaryotes by the absence of chloroplasts. Cyanobacteria can be subdivided into two varieties: those that can fix nitrogen and those that cannot fix nitrogen. Cyanobacteria that can fix nitrogen have an advantage over other bacteria in nutrient poor waters, particularly those which are depleted in nitrogen sources (mainly nitrate or ammonia).

¹ Plankton is a general term given to describe all the small free living plants (phytoplankton) and animals (zooplankton) in the marine environment.

The eukaryotic phytoplankton community has long been a "black box" in terms of its composition as well as its contribution to the global carbon fixation. It includes several major lineages of chlorophyll- containing algae, including Heterokontophyta, Haptophyta and Chromalveolata. Diatoms constitute a known group of algae belonging to the phylum Heterokontophyta. The diatoms produce a silica test (frustule) and have chloroplasts. Dinoflagellates belong to the phylum Chromalveolata. About half of Dinoflagellates are photosynthetic, and these make up the largest group of eukaryotic algae after the diatoms. Coccolithophores are among the best known microorganism of the phylum Haptophyta. They have an exoskeleton of calcareous plates called coccoliths.

The quantification of this phytoplankton primary production is difficult because its activity varies greatly (in longitude and latitude) over the three oceans, depending strongly on various parameters such as sunlight intensity, water temperature, nutrient concentrations, etc. Until now, cyanobacteria have been considered to be the major contributors to carbon fixation in the open ocean. Eukaryotic phytoplankton are also important primary producers in the photic zone, even though they appear to be much less abundant than cyanobacteria. The eukaryotic phytoplankton could also contribute to almost half of the ocean's carbon fixation by phytoplankton. For example the Prymnesiophytes, among the phylum Haptophyta, could account for up to 38% of the total primary production in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean (Jardillier *et al.*, 2010).

Carbonate production

These primary producers are not only responsible for biomass production, but some are also responsible for marine carbonate production (calcite and aragonite) through the formation of calcareous tests and non-structured carbonate. Many species of micro-organisms capable of CaCO_3 precipitation are found in both freshwaters and marine environments. Carbonate deposits throughout Earth's history are a striking demonstration of the biological mechanisms contributing to the huge precipitation of calcium carbonate in the oceans, and consequently to long term storage of carbon dioxide (CO_2). Cyanobacteria, especially in the Precambrian Period, are responsible for stromatolite formations covering wide shelf basins (Riding, 2006), and coccolithophores, during the late Cretaceous Period, have produced the voluminous chalk deposits that gave the period its name.

Transfer of the energy produced by the phytoplankton through photosynthesis into the ocean ecosystem: the biological pump

The traditional view of organic carbon fluxes for the transfer of the energy produced by the phytoplankton through photosynthesis into the ocean ecosystem, has three main pathways. The first route is the direct consumption by zooplankton (grazing). The second pathway is the rapid re-mineralization by bacteria and micro-zooplankton, the so-called "microbial loop" that occurs in surface and intermediate waters. The third pathway is the transport from the surface water through the whole water column to the bottom (ocean floor), fuelling the benthic production. Additionally, tests of dead organisms (phytoplankton such as coccolithophores, zooplankton such as foraminifera, etc) reach the sea floor and contribute to the carbon sink. This non-remineralized exportation, although very minor in comparison to the primary production, contributes to carbon sequestration on the ocean floors and is currently estimated to be 0.4 to 0.5 Pg y⁻¹.

This view is obviously simplified; the reality is much more complicated. Indeed, the evaluation of the steady state phytoplankton biomass remains a challenge, since it is simultaneously the carbon source for zooplankton in the food chain (grazing), very susceptible to viral attack, and subject to coagulation forming organic aggregates that sink to deeper waters. Of these, the organic carbon exportation is probably the most difficult phenomenon to understand. The primary producers are responsible for a rain of particulate matter in the water column (known as sea snow), where the tests of phytoplankton join with zooplankton (i.e. pelagic tunicates, pteropods) act as ballast. High-biomass diatom blooms (that occur only intermittently in the open oceans) have conventionally been thought to be the main contributors to the sink of organic matter in the seawater column. However, it has recently been postulated that a background food web based on very small unicellular plants (picoplankton with a diameter <5 µm) could also contribute to organic matter exportation (Richardson and Jackson, 2007). These small phytoplankton are present in all the open oceans and are continuously active throughout the year (as opposed to the intermittent blooms).

The exportation to deep waters of a part of the primary photosynthetic production severely impacts the chemical composition of both the surface and deep waters in the three major oceans. In surface water, the carbonate concentration is affected by two opposing phenomena: it increases due to photosynthesis and it decreases due to (bio)calcification and

CO₂ exchange (see below). In deep waters, both Total Alkalinity (TA)² and Dissolved Inorganic Carbon (DIC) increase with the influx of part of the primary photosynthetic production. As the imported production is re-mineralized in the deep waters, it contributes to the release of CO₂ (acidification of the water) and consequently enhances the calcium carbonate dissolution. Today, the DIC and TA³ in the deep waters are respectively about 220 μmol.kg⁻¹ and 50 to 150 μmol kg⁻¹ higher than in the surface waters (Feely *et al.*, 2004).

Biological impact of anthropogenic CO₂ oceanic uptake

Rising atmospheric carbon dioxide (CO₂) concentrations over the past two centuries have led to greater CO₂ uptake by the oceans. This CO₂ uptake results in acidification of the oceans due to the change in the carbonate system. This pH change occurs in the upper zone of the ocean that actively participates to the CO₂ exchange with the atmosphere, and can potentially significantly impact the biological systems in the oceans. We have presented in the previous chapters the strong involvement of the phytoplankton activity in bio-geochemical cycles, particularly the carbon cycle, through the primary production (Boyce and *al.*, 2010). It is of prime importance to understand macro-ecological changes in the ocean resulting from acidification (i.e pCO₂) and temperature changes. A decline of the global phytoplankton population by 1% each year in eight out of ten ocean regions has been reported (Boyce et al, 2010). Nevertheless, we are only beginning to understand some of the future impacts on the biological systems in the oceans due to these macro-ecological changes.

Among the most clearly observed phenomenon, the acidification of the seawater surface (via CO₂ trapping from the atmosphere) modifies the *in-situ* carbonate concentration curve and contributes to the upward migration of the calcite and aragonite saturation horizons. This phenomenon could have an effect on the carbon sink (i.e. sequestration of CaCO₃ through incorporation into the sediments) by rapidly increasing the dissolution of CaCO₃ during exportation to deep waters (when Ω is <1).

As for the biological impact, the acidification of the oceans possibly has an impact on the delicate balance of marine planktonic species, especially on microorganisms with calcareous tests for which a “grim future” was predicted. Barker and Elderfield (2002) have highlighted a relation between calcification and carbonate ion concentration in these coccolithophore and foraminiferan calcareous contributors. The reduction of the carbonate

²Total Alkalinity : [HCO₃⁻] + 2[CO₃²⁻]

³During calcification, CaCO₃ is precipitated by using one CO₃²⁻, thereby reducing dissolved organic carbon and total alkalinity in a molar ratio of 1:2. Carbonate dissolution causes the reverse reaction.

saturation state below a threshold value (due to carbonate concentration decrease) will lead to large decreases in biological calcification rates, even when calcite saturation (Ω) is greater than one.

Such a decrease in the CaCO_3 production would possibly affect carbon sequestration via incorporation in the sediments (carbon sink), if the process of CaCO_3 ballasting of organic carbon is essential, as is commonly believed. Nevertheless, this question of biological matter exportation is not fully resolved. It appears to depend not only on ballast with pelagic tunicates, such as pteropods (therefore phytoplankton balance is important), but also on the participation of very small unicellular plants (see Richardson and Jackson (2007) commented by Barber (2007) about the evocated complicated picoplankton food web).

Finally, rising CO_2 concentrations affect the water surface temperature, resulting in upper-ocean stratification in the next 50 years (Rost et al., 2008). This will lead to a reduced nutrient supply at the surface, to a modified light transmission to deeper water zones, and perhaps to a change in the respective contribution to the NPP (Net Primary Production) by pico- and microplankton.

Consequently, some concepts about oceanic bio-geochemical cycling will need to be revisited, such as our general view of the food web, which is continuously changing.

General strategies of inorganic carbon uptake

Bicarbonate and CO_2 are the two possible mineral carbon sources for aquatic photosynthesis activities. The effective selection of the carbon source by the photosynthetic organisms is dependant on environmental conditions. Most known algae can take up both HCO_3^- and CO_2 , although there are some exceptions. No matter which carbon source is used, all the photosynthetic organisms ultimately assimilate the CO_2 using a universal and essential enzyme called Rubisco, which is short for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Rubisco is the first and the key enzyme in the photosynthetic assimilation of inorganic carbon into organic carbon compounds through the Calvin-Benson cycle (the C_3 pathway). In addition to the carboxylating reaction, Rubisco is used in photorespiration, acting as an oxygenase. This highly conserved enzyme has a low affinity for CO_2 . Consequently, cyanobacteria and eukaryotic microalgae have developed various strategies to overcome constraints on carbon assimilation under the low CO_2 concentrations present in modern seawater ($\approx 10 \mu\text{mol l}^{-1}$). All these strategies have the same objective, namely to elevate CO_2 concentration in the vicinity of the Rubisco. It is commonly mentioned that Cyanobacteria,

thanks to their CO₂ Concentrating Mechanisms (CCM), can increase CO₂ concentration close to Rubisco in the carboxysome by 10 up to 1000-fold. The major categories of CCM in terrestrial and aquatic phototrophs have been extensively studied and well reviewed by Giodano *et al.* (2005), Price *et al.* (2008), and Roberts *et al.* (2007). As opposed to cyanobacteria, the microalgae do not possess a carboxysome structure and have instead developed another strategy, also sometimes confusingly referred to as CCM, to overcome the CO₂ limitation and to saturate Rubisco. Stable isotope measurements (¹³C/¹²C ratio) of organic cellular material can be used to indicate the presence of the CCM capacity of algae. Isolated eukaryote Rubisco discriminate against ¹³C to the extent of ~30%. Consequently, species without CCM may show isotope discrimination ratios approaching this value. However, CCM tends to reduce this discrimination.

Among CCM variants, active membrane transport of HCO₃⁻ and/or CO₂ is identified. This requires that the membrane across which active transport occurs has a low permeability for the DIC species delivered to the side of membrane closer to Rubisco, otherwise active transport becomes short-circuited (Raven and Beardall, 2003). This rules out two plastid membranes in eukaryotes, as well as in the gram-negative cyanobacteria outer membrane, which have high porin densities. These porins are membrane proteins which allow non-selective membrane crossing for molecules with a molecular mass below 800. Moreover, a range of carbonic anhydrases (CAs), including external (extracellular) CA, is involved for inter-conversion between the two carbon species CO₂ and HCO₃⁻ in the various compartments (cytosol, chloroplast).

Photosynthesis and Calcification with Cyanobacteria

Cyanobacteria probably have the most effective biological system to assimilate inorganic carbon (Ci), regardless of the dissolved CO₂ concentration, in various habitats, such as benthic microbial mats or planktonic blooms. In cyanobacteria, the CCM uptake system includes different Ci transport systems associated with a carboxysome. The Ci transport can be based on either CO₂ or HCO₃⁻, either at the plasmalemma or the thylakoid membrane (Kaplan and Reinhold, 1999; Klughammer *et al.*, 1999; Omata *et al.*, 1999; Raven and Beardall, 2003; Ritchie *et al.*, 1996). The CO₂ concentration takes place in the carboxysome inside the cytosol of the cell.

Carboxysome in cyanobacteria

A carboxysome is a micro-compartment that contains enzymes involved in carbon fixation. HCO_3^- diffuses from the cytosol into the carboxysome (Lane *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2002; Smith and Ferry, 2000; Sültemeyer, 1998) and is cleaved into CO_2 by carbonic anhydrase (CA), an enzyme which is confined to the carboxysome and has never been found in the cytosol of cyanobacteria. Other enzymes of the Calvin cycle are located outside the carboxysome. A carboxysome spatial structure has been proposed in which CA is positioned in the centre of the carboxysome, allowing an efficient catalytic action of the Rubisco. In this dense packing of Rubisco and CA, the generated CO_2 is used up before it can diffuse across this thick intracarboxysomal protein arrangement. This system acts as a substantial barrier to CO_2 diffusion and leakage from the carboxysome, increasing the CO_2 concentration inside this structure in a higher steady-state value than in the bulk medium. This proximity of the CA and the Rubisco compensates for the low CO_2 affinity of Rubisco (depression of the photorespiration) (Kaplan and Reinhold, 1999; Ludwig *et al.*, 2000).

CO_2 and HCO_3^- -uptake systems in cyanobacteria

Cyanobacteria are known to use bicarbonate and CO_2 as mineral carbon sources. A number of CO_2 and HCO_3^- transporters contribute to the accumulation of HCO_3^- in the cytosol. The various transporters move (HCO_3^- from the periplasm to the cytosol regardless of the DIC species (CO_2 or HCO_3^-). The HCO_3^- accumulated in the cytosol then diffuses into the carboxysome.

HCO_3^- is moved via an active transport mechanism using $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ symports (sodium-dependant transporters) or ATP-driven uniports (an ABC-type high affinity transporter), both of which function at low CO_2 levels. However, the symports are probably absent in all marine strains. Both of these active transport enzymes are localized on the cytoplasmic membrane (plasmalemma) and present a K_m (the concentration of DIC which allows one half of the maximum velocity of photosynthesis) value of 12~15 μM for HCO_3^- .

CO_2 enters a cell by diffusion through aquaporins and is converted into HCO_3^- by NADPH dehydrogenase (NDH) complexes on the thylakoid and plasma membranes. No active transport systems have been found in the plasmalemma of cyanobacteria, however two CO_2 uptake systems have been reported. One is induced by low CO_2 concentration, and the other one is constitutive. The K_m value of the low-inducible CO_2 transporter is low (0.8 μM)

and remains constant when cells are transferred from high to low CO₂ conditions. Nevertheless, the V_{max} of uptake can increase significantly with environmental changes, suggesting increased synthesis of the enzyme (Price and *al.*, 2008).

When cells are exposed to Ci limited conditions (< 50 ppm), the inducible transport systems for both CO₂/HCO₃⁻ are activated and are accompanied with increased Rubisco activity in carboxysome content (Price and *al.*, 2008).

CO₂ leakage from the carboxysome is possible. Nevertheless, the CO₂ uptake activities associated with the NDH-1 CO₂ complexes on the thylakoid membrane may contribute to the recycling of this leaked CO₂ (Price and *al.*, 2008). So, there is no clear distinction between CO₂ and HCO₃⁻ for use as a mineral substrate.

All these transporters (bicarbonate and CO₂) appear to use photosynthetic energy, both in the form of ATP and of reducing equivalents, such as NADPH, to drive their reactions. Light energy is used to maintain the cytoplasmic concentration of CO₂ below chemical equilibrium by converting it to HCO₃⁻. This release of HCO₃⁻ in the cytosol, where its concentration may exceed 50 mM, necessitates a unidirectional conversion of CO₂ to HCO₃⁻. Consequently, a supply of OH⁻ ion is needed, which may be produced by the reduction of NADP⁺ to NADPH. The OH⁻ could be also obtained through the NDH-1 complex via Zn-H₂O conversion to Zn-OH⁻ (Price et al., 2002). This conversion of CO₂ into HCO₃⁻ is accompanied by a proton production.

Moreover, in many situations, the amount of Ci taken up by the cells exceeds the quantity used in photosynthesis. This excess Ci leaks out of the cells and can be re-imported. This massive Ci cycling flux could be a protection strategy developed by the cyanobacteria against excess light conditions by dissipating excess light energy (Tchernov et al., 2003).

Interestingly, the explanation as to why many cyanobacteria and eukaryotic microalgae have the ability to tolerate very high CO₂ concentrations, in some cases well above 50% CO₂ (Miyachi et al., 2003; Gressel, 2008; Papazi et al., 2008), might be found in the CCM. Inhibition of Rubisco through acidification under high CO₂ conditions is prevented by the CA reaction and by state II transition of Photosynthesis Electron Transport (PET) (rearrangement of the phycobilisomes to favour light absorption by PS I) (Miyachi et al., 2003).

Figure 1 presents a model of the carbon-concentrating mechanism (CCM) in the cyanobacterial cell. This figure also shows the calcification process that can operate if calcium is present in the environment.

Photosynthesis and calcification

Although cyanobacteria calcification has been long recognized, its physiological function is still not clearly known. Calcification appears as a non-obligate process that is consecutive to photosynthetic growth; in particular, cyanobacteria can grow in calcium deprived environments. As presented above, the inorganic carbon import mechanism appears to rely on the two most important components: "cyanobacteria CCM" (an active uptake system for both CO_2 and HCO_3^-) and carboxysome structure.

As also mentioned, whatever the inorganic carbon source used for the photosynthesis, only bicarbonate is present in the cytosol. The bicarbonate then diffuses into the carboxysome structure, where the CA immediately generates CO_2 for Rubisco. When HCO_3^- is the predominant substrate, the conversion of HCO_3^- to CO_2 in the carboxysome will result in a net production of OH^- inside the cell that will either need to be excreted or neutralized by H^+ uptake from the external medium. This proton pump or OH^- expulsion may cause a rise in pH outside the cell, shifting the carbonate equilibrium toward an increase in carbonate (CO_3^{2-}), resulting in a nano-scale carbonate oversaturation condition favourable for calcium carbonate precipitation. Nucleation could take place, and may be facilitated by the membrane surface that provides nucleation sites (Obst et al., 2009). From then on, the crystal growth could proceed as a strictly chemical process. The ionic strength was shown to catalyze calcite nucleation (Bischoff, 1968b). Zuddas & Mucci (1998) postulated a two-step precipitation process of adsorption followed by ion incorporation into the crystal lattice. For example, in the case of $a[\text{Ca}^{2+}] \gg a(\text{CO}_3^{2-})$ the precipitation rate is limited by the CO_3^{2-} adsorption rate.

Photosynthesis and calcification with coccolithophores

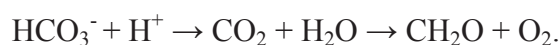
Most of the efforts in investigating carbon uptake in test-forming eukaryotic organisms are focused on diatoms and coccolithophores. These organisms are representative functional groups of marine phytoplankton. Diatoms which have siliceous tests are not treated in this review, which is focused on biological carbonate formation.

CO_2 and HCO_3^- and calcium uptake systems in *Emiliana huxleyi*

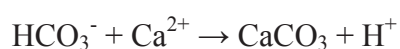
Although there are numerous existing coccolithophore species, the calcification studies have mainly been limited to those that are easily maintained in laboratory cultures, in particular the cosmopolitan coccolithophore species *Emiliana huxleyi*. It clearly appears from

the laboratory studies that the strain *Emiliana huxleyi* EH2 lacks efficient mechanism to facilitate a high DIC gradient between the external medium and the cytosol. This gradient is one to two orders of magnitude smaller than in cyanobacteria and several times smaller than in green algae (Tsuzuki and Miyachi, 1990). *Emiliana huxleyi* is a marine unicellular calcareous alga which can moderately concentrate DIC (~13-16 times) (Sekino and Shiraiwa, 1994) and presents a low affinity for CO₂ (apparent $K_{0.5DIC}$ equal to 55 μ M for CO₂ at pH 8.0 and 25°C) and an apparent $K_{0.5DIC}$ of 5.5 mM for DIC ($K_{0.5DIC}$: the concentration of DIC which allows one half of the maximum velocity of photosynthesis) (Sekino and Shiraiwa, 1994). Consequently, the photosynthesis rate is not maximal at present-day marine bicarbonate concentration, and increases under elevated CO₂ levels (Herfort et al., 2002). This low-affinity for DIC in *E. Huxleyi* has also been reported by many others authors (Paasche 1964, Nielsen 1995, Riebesell et al. 2000, Berry et al. 2002, Zondervan et al. 2002, Rost et al. 2003, Leonardos and Geider 2005, Iglesias-Rodriguez et al., 2008). However, the state of the CA remains unclear. The lack of CA in *E. huxleyi* has been mentioned by many authors (Sikes and Wheeler, 1982; Nimer et al., 1994; Sekino and Shiraiwa, 1994). Conversely, CA induction has been reported at 0.5 mM DIC in *E. huxleyi* (Herfort et al., 2002), but Quiroga and Gonzalez (1993) hypothesized the suppression of CA induction when growing under high external DIC concentration (above 1 mM).

The link between photosynthesis and calcification was suggested as early as 1962 (Paasche, 1964). From a metabolic point of view, growth can be performed on both CO₂ and bicarbonate, but bicarbonate is the only inorganic carbon source used for the calcium carbonate production. Nimer et al. (1995) proposed a growth model using HCO₃⁻ as substrate for both photosynthesis and calcification (Figure 2). In this model, calcification using bicarbonate as an inorganic carbon source supports the photosynthesis. HCO₃⁻ entry contributes to CO₂ supply at the Rubisco site, which in turn is consumed during photosynthesis through the action of the CA in the chloroplast compartment as presented in the following equation:



The simultaneous linked calcification uses a second HCO₃⁻ molecule to provide the required proton (H⁺) for the photosynthetic reaction:



Furthermore, experiments with radiotracers have confirmed the global equation (Sikes et al., 1980):



The protons produced during the calcification are used for the internal CO₂ production with an efficiency that has been estimated to be approximately 1 for *E. huxleyi* strain Ch 24-90. This value confirms the idea that there is a tight coupling between calcification and photosynthesis (Buitenhuis et al., 1999). It should be noted that for HCO₃⁻ concentrations below 0.5 mM, the calcification rate is equal to zero.

This tight coupling between calcification and photosynthesis could be interpreted as an evolutionary mechanism to optimize the use of the dissolved inorganic carbon in low CO₂-concentration marine environments, and as an alternative to the CCM developed by the cyanobacteria. This mechanism offers the advantage of maintaining a pH homeostasis in the chloroplast and in the coccolith mineralizing vesicle. Intracellular calcification has also been interpreted as reducing the energy cost for transporting CO₂ inside the cells, thus enhancing photosynthetic carbon fixation (Anning et al., 1996).

However, variations of this calcification/photosynthesis ratio (C/P ratio) have been obtained in laboratory conditions with constant HCO₃⁻ concentrations and CO₂ increases. The observed decreasing ratio suggested a photosynthetic growth on CO₂ which was decoupled from calcification process (Buitenhuis et al., 1999). Using a strain of *E. huxleyi* deficient in both internal and external CA, insights have been obtained on the specific role of CO₂ and HCO₃⁻ for photosynthesis and calcification by performing radiotracer pulse experiments adding ¹⁴CO₂ and ¹⁴C-HCO₃⁻ separately. ¹⁴CO₂ was recovered mainly in the biomass and a DIC pool, but scarcely appeared in the CaCO₃ fraction. In contrast, ¹⁴C-HCO₃⁻ was incorporated mainly into CaCO₃ and into a DIC pool and hardly any was recovered in the biomass (Sekino and Shiraiwa, 1994). Additionally, a growth on ¹⁴CO₂ with a photosynthesis inhibitor (like DCMU) allows the DIC pool to be incorporated into CaCO₃, but no incorporation of ¹⁴C in DIC was found. Furthermore, the incorporation of ¹⁴C-DIC into CaCO₃ was effective in darkness (Sekino and Shiraiwa, 1994, 1996). 1-hydroxyethylidene bisphosphonic acid (HEBP), an inhibitor for the growth of CaCO₃ crystals, partially suppresses incorporation of ¹⁴C-DIC into the DIC-pool and totally suppresses its incorporation into the production of CaCO₃. These authors suggested a more complex model in which a "pre-formed CaCO₃ (HCO₃⁻ pool or DIC pool)" may be used as carbon source for photosynthetic fixation of CO₂, illustrated as "recycling of DIC" in Figure 3, possibly operating under DIC-limited or depleted conditions.

In fact, coccolithophorids show species-dependent variations in their photosynthetic DIC utilization and great variations in CaCO₃ production among algal cells obtained from

different ecosystems (Nimer and Merrett, 1992). The ratio between CaCO_3 production and photosynthetic fixation of CO_2 could vary from 1/20 to 1/1, according to the strain of *E. huxleyi* (Sekino and Shiraiwa, 1994). This species-dependent variation is a part of the great discrepancy observed in the coccolithophores world (Marsh, 2003). Indeed, "non-calcifying coccolithophores" have been mentioned and interpreted (perhaps wrongly) as either species which lost the ability to form calcified coccoliths or as unidentified coccolithophore species representing non-mineralizing phases (Edvardsen et al., 2000; Fujiwara et al., 2001). Considering such variation in the photosynthesis DIC utilisation, calcification and "calcifying and non-calcifying" coccolithophores, attention has been drawn to factors affecting the balance between photosynthesis and calcification.

Factors affecting the balance between growth and calcification: role of environmental variables

Since the work of Paasche (1964) and of Sekino and Shiraiwa (1994), environmental variables have been suspected to be responsible for unbalanced regulation between photosynthesis and calcification. Such an inverse relationship between algal growth and calcification has also been observed with nitrate or phosphate sufficient and deficient cultures (Paasche, 1998, Sorrosa et al., 2005, Paasche and Brubak, 1994; Riegeman et al., 2000). Moreover, these limitations in nitrogen and phosphorous have been considered as the prime reason for the decline of ocean blooms (Bratbak et al., 1993; Egge and Heimdal, 1994; Van der Wal et al., 1995). Microelements have also been shown to affect the growth of coccolithophores. For example, selenium is also effective at regulating coccolithophorid growth, although the relationship with calcification was not examined (Danbara and Shiraiwa, 1999). Sorrosa et al., (2005) suggested that the growth could also be stimulated by iron enrichment, and the calcification excited by the temperature decrease.

In the case of excess bicarbonate concentrations, as in marine environments, and without limitation of nutrients (nitrogen and phosphorous) or micronutrients (such as selenium, cobalt and zinc), the growth of coccolithophores will be not limited. This "favourable growth situation" has tentatively been reproduced in laboratory experiments with high bicarbonate concentrations (20 mM), largely exceeding concentrations encountered in marine environments. Under these conditions, Sorrosa et al., (2005) reported that in a laboratory culture, the cell size of *E. huxleyi* EH2 increases, but not the number of cells. This high bicarbonate concentration results mainly in a strong stimulation of calcification, but does

not favour the cell growth. However, its mechanism is not yet fully understood. Conversely, the number of cells increases when *E. huxleyi* EH2 is cultivated in bicarbonate limitation (Fritz and Balch, 1996; Fritz, 1999). Calcification inhibition by HEBP also contributes to cell growth and to cell size decrease.

This inverse relationship between cellular division and calcification in experimental conditions with different limiting factors leads to a speculation about the occurrence of coccolithophore blooms in marine environments. Favourable growth conditions in marine water under unlimited inorganic carbon supply contribute to a progressive depletion of macro or micro nutrients in the seawater surrounding the bloom. The depletion in one of these parameters stops the cell division in the bloom and consequently favours calcification conditions.

The very efficient nitrate uptake found in *E. huxleyi* is also important to note (the half-saturation constant for nitrate uptake is very low: 100 nM) (Epply et al., 1969, 1971). Indeed, this physiological characteristic may contribute to efficient growth in the bloom (practically logarithmic growth) until almost complete nitrate depletion, and consequently to a marked situation of limitation resulting in spectacular physiological change.

In conclusion, the calcification function(s) of coccolithophores remain mysterious because the physiology of this functional group is complicated. Paasche (2002) suggested that the high coccolith production at low temperatures may also increase the survival probability. The coccolith production might also have important cell protecting functions to limit photo-damage by consuming excess energy produced at low temperatures under strong light when photosynthesis is oversaturated because of the suppression of energy-consuming processes (photosynthesis for cell multiplication). In this situation, the production of coccoliths may greatly exceed the number necessary to make the overall test and this overproduction could shed in the culture medium. Sekino et al. (1996) suggested that the presence of coccoliths on the cell surface might present more ecological advantages than physiologic benefits. This could be deduced by the fact that artificially made protoplasts (naked cells) of *E. huxleyi* showed the same growth curve in a laboratory culture as did the wild strain.

Sensitivity of phytoplankton to ocean acidification

Biologically induced calcification processes, whether highly controlled (skeleton formation, as in coccolithophores) or induced as a by-product of biological activity (as in

cyanobacteria), are necessarily linked to cellular metabolism e.g. photosynthesis. We have reviewed in the previous paragraphs the specifics of the carbon uptake strategies developed for growth and calcification by cyanobacteria and coccolithophores.

The necessity to assess the effects of the rising atmospheric CO₂ concentration on phytoplankton has emerged at the end of 20th century, primarily to understand the observed impact on tropical coral reefs (Gatusso et al., 1998; Leclercq et al., 2000). Comprehensive knowledge of factors acting in the respective balance of organic (photosynthesis) and mineral (calcification) carbon fixation for these two types of organisms is of prime importance, in particular for a better understanding of their current behaviour in regard to the accelerated physico-chemical environmental changes with the present climate changes [temperature, light exposure, pH (bicarbonate/carbonate ratio), and variation of pCO₂].

Coccolithophore response

As the majority of biogenic carbonate precipitation (80%) is due to planktonic microorganisms, coccolithophores also came very quickly into the focus of interest. As previously mentioned, *Emiliana huxleyi* growth could be stimulated by CO₂ because of its low affinity for CO₂. Nevertheless, Riebesell et al. (2000) suggested that calcification by coccolithophores may decrease in response to ocean acidification and consequent elevated pCO₂. The range of CO₂ experimented is between 280 and 750 ppmv (up to 3 times the atmospheric concentration from the beginning of the 20th century). The same conclusion has been obtained by Dellile et al. (2005) in laboratory studies, but recent contradictory findings obtained by Iglesias-Rodriguez et al. (2008) showed a stimulation of the calcification rather than a reduction under elevated pCO₂.

Taking into account the knowledge of environmental variables suspected to be responsible for unbalanced regulation between photosynthesis and calcification and the great discrepancy observed in the coccolithophores world (Marsh, 2003), these contradictory findings could possibly be attributed to different coccolithophore species used in the experiments. In addition, *Emiliana* is not only atypical in its high rate of calcium secretion (as a coccolith), but also unusual in having arisen only 268 k.y. ago (Thierstein et al., 1977). Nevertheless, *E. huxleyi* is a predominant player in the oceanic CO₂ fixation with a mass involvement estimated at 30% (Milliman et al., 1993).

Cyanobacterial response

Recent studies concerning the effect of elevated CO₂ have been reported on bloom-forming cyanobacteria. As mentioned previously, the cyanobacteria possess a Rubisco with very low CO₂ affinities (K_m varies from 105 to 185 $\mu\text{mol l}^{-1}$) (Badger et al. 1998). With increasing CO₂ pressure, a higher growth rate would be expected. Indeed some studies accord high positive effects of CO₂ increase on the growth rate of cyanobacteria (Barcelos e Ramos et al., 2007, Hutchins et al., 2007, Levitan et al., 2007).

The nitrogen-fixing cyanobacteria are already strongly implicated in tropical and subtropical areas where they provide a nitrogen source to the food chain after their decomposition (Falkowski 1998, Gruber and Sarmiento 1997). A possible consequence of cyanobacterial growth stimulation by CO₂ would be the expansion of the marine nitrogen fixation, in particular in high latitude oligotrophic regions, concurrently with a warming climate, stratification, as well as nitrate and phosphorous limitations (Boyd & Doney 2002).

Nevertheless, as with coccolithophores, recently published studies raise numerous questions on the previous understanding of this functional phytoplankton group. For instance, it appeared that changes in CCM efficiency under elevated pCO₂ tended to improve resource allocation between photosynthesis, carbon acquisition and nitrogen-fixation (Kranz et al., 2009).

Calcification in modern Oceans

Cyanobacteria and calcification in hard lake and marine waters

The question of calcification by cyanobacteria in modern oceans and lacustrine environments has been extensively discussed, but is still not fully understood. Numerous field studies have stimulated interrogation on biologically active precipitation with cyanobacteria. Two case studies are well reviewed: the Fayetteville Green Lake (FGL), a hard water lake (Thompson and Ferris, 1990, Thompson et al., 1997) and the Great Bahamas Bank (GBB), a marine environment (Thompson, 2000). On the FGL site, sedimentation rates of carbonate precipitates have tentatively been estimated from field and experimental data. Thomson et al. (1997) measured up to 3.5 - 4.0 mg of calcite precipitation per litre in the open water column (between the water surface and a depth of 2 m) during the spring, and even more during the summer at depth of 8 m. This calcite precipitation occurs concurrently with a decrease of dissolved inorganic carbon (between 4 and 2.5 mM). The $\delta^{13}\text{C}$ value of the dissolved

inorganic carbon (mainly bicarbonate) increases at the same time and may be attributed to the selective uptake of $\delta^{12}\text{C}$ for photosynthetic CO_2 fixation by the cyanobacterial bloom. Conversely, the most recent carbonates (from bottom sediments) appeared to be highly enriched in $\delta^{13}\text{C}$ with respect to isotopic equilibrium with the lake water DIC. A similar $\delta^{13}\text{C}$ carbonate enrichment has been reproduced in laboratory microcosms using the water and the microflora from the site.

Despite the fact that a common mechanism might induce marine and lacustrine whittings, evidences of whiting in marine environment are not so easy to establish. Moreover, a major difference between carbonates from lacustrine and marine whittings is the inherent Mg/Ca ratio between fresh and marine waters (marine waters are richer in Mg). The source of whittings on the Great Bahama Bank has been the longest and most hotly debated topic in carbonate geochemistry. In Great Bahama Bank, *Synechococcus* appeared to be slightly more abundant within whittings than in the surrounding clear water. Nevertheless, the Bank waters are nutrient-poor (nitrate and phosphate are generally below $0.1\ \mu\text{M}$), and consequently are unfavourable for bloom formations. Any chemical shifts between whittings and the surrounding clear water in the Bahamas have never been observed (Morse et al., 1984). Morse and Mackenzie (1990) suggested that these whiting events could be some pure inorganic process; they favoured the idea that suspended carbonate particles from a repetitive re-suspension process may act as nuclei for inorganic precipitation. Furthermore, estimated annual rates of sedimentation calculated from all of the material suspended in whittings were approximately 3 times the bank top Holocene observed (Robbins et al., 1997). Morse et al., (2003) concluded that a slow calcium carbonate precipitation on re-suspended carbonate sediments, rather than new calcium carbonate precipitation in the water column, resulted in the formation of a whiting.

Coccolithophores and calcification in marine waters

The ability of coccolithophores to form blooms in coastal waters has been known since the beginning of last century (Gran, 1912). Thus this group of phytoplankton are thought to contribute to carbon deposits in the form of CaCO_3 on seafloors situated above the lysocline (Bramlette, 1958). However, their large-scale occurrence was only shown by ocean colour imagery through detection of high reflectance signal measured by satellites (Holligan et al., 1983, Groom & Holligan 1987). NASA even provides a permanent satellite survey of their occurrence (Shutler et al., 2010). Paasche (2002) estimated from field investigations that

the contribution of *E. huxleyi* to calcite mass and to total seafloor calcite is about 5% or less. Consequently, *E. huxleyi* has to be considered only as a minor contributor in the deposition of carbonate on the seafloor.

An extensive bloom (250 000 km²) of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* that developed in the northeast Atlantic in June 1991 was monitored over 15 days (Fernandez et al., 1993). The particular organic carbon (POC⁴) and particular inorganic carbon (PIC) analysed in this gigantic bloom were in the order of 200 mg m⁻³ and 300 mg m⁻³ respectively. The coccoliths/cell ratio ranged between 20 and 40. In addition, photosynthetic rates as high as 40 mg C m⁻³ h⁻¹ were measured over the top 35 m of the water column. This corresponds to an integrated daily organic carbon production rate of about 1 g C m⁻² d⁻¹. Significant rates of inorganic carbon production were measurable only in surface waters and integrated daily rates of inorganic carbon production were estimated around 50 - 200 mg C m⁻² d⁻¹. These values indicate that the percentage of carbon incorporated into coccoliths appeared to never be higher than 25%. This may be due to additional biomass production by non-coccolithophore phytoplankton. The production of calcite by this bloom in the North-East Atlantic has been estimated to be about 1.0×10⁶ t of calcite-C. Ultimately, the significance of this coccolithophore bloom for CO₂ air-sea exchange depends on the PIC/POC ratio of the particulate material which will eventually be buried into the sediments.

References

- Anning T., Nimer, N., Merrett M. J., and Brownlee C., 1996. Costs and benefits of calcification in coccolithophorids. *Journal of Marine Systems* **9**, 45-56.
- Badger M. R., Andrews T. J., Whitney S. M., Ludwig M., Yellowlees D. C., W. Leggat W, and Price G. D., 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Journal of Experimental Botany* **76**, 1052-1071.
- Barber RT. 2007 Picoplankton Do Some Heavy Lifting. *Science* **315** pp777-778
- Barcelos e Ramos, J., Biswas, H., Schulz, K. G., LaRoche, J., and Riebesell, U., 2007. Effect of rising atmospheric carbon dioxide on the marine nitrogen fixer *Trichodesmium*. *Global Biogeochem Cycles* **21**, GB2028.

⁴ POC for particulate organic carbon: by subtraction PIC from TPC. TPC and PIC were estimated from bloom material retained on filter. TPC was obtained with elemental analysis (C content). PIC was estimated from the measured calcium content, assuming that all of the particulate calcium was present as calcium carbonate.

Barker S., H. Elderfield, (2002) Foraminiferal calcification response to glacial-interglacial changes in atmospheric. *Science* **297**, 833 (2002).

Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., McClain, C. R., Feldman, G. C., Los, S. O., Tucker, C. J., Falkowski, P. G., Field, C. B., Frouin, R., Esaias, W. E., Kolber, D. D., and Pollack, N. H., 2001. Biospheric Primary Production During an ENSO Transition. *Science* **291**, 2594-2597.

Berry, L., Taylor, A. R., Lucken, U., Ryan, K. P., and Brownlee, C., 2002. Calcification and inorganic carbon acquisition in coccolithophores. *Functional Plant Biology* **29**, 289-299.

Bischoff, J. L., 1968. Kinetics of Calcite Nucleation: Magnesium Ion Inhibition and Ionic Strength Catalysis. *Journal of Geophysical Research* **73**, 3315-3322.

Boyce, D. G., Lewis, M. R., and Worm, B., 2010. Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* **466**, 591-596.

Boyd, P. W. and Doney, S. C., 2002. Modelling regional responses by marine pelagic ecosystems to global climate change. *Geophysical Research Letters* **29**, 1806.

Bramlette, M. N., 1958. Significance of coccolithophorids in calcium carbonate deposition. *Geological Society of America Bulletin* **69**, 121-126.

Bratbak, G., Egge, J. K., and Heldal, M., 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms *Marine Ecology Progress Series* **93**, 39-48.

Buitenhuis, E. T., de Baar, H. J. W., and Veldhuis, M. J. W., 1999. Photosynthesis and calcification by *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) as a function of inorganic carbon species. *Journal of Phycology* **35**, 949-959.

Danbara, A. and Shiraiwa, Y., 1999. The Requirement of Selenium for the Growth of Marine Coccolithophorids, *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp. (Prymnesiophyceae). *Plant and Cell Physiology* **40**, 762-766.

Delille, B., Harlay, J., Zondervan, I., Jacquet, S., Chou, L., Wollast, R., Bellerby, R. G. J., Frankignoulle, M., Borges, A. V., Riebesell, U., and Gattuso, J.-P., 2005. Response of primary production and calcification to changes of pCO₂ during experimental blooms of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Global Biogeochem. Cycles* **19**, GB2023.

Edwardsen, B., Eikrem, W., Green, J. C., Andersen, R. A., Moon-van der Staay, S. Y., and Medlin, L. K., 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia* **39**, 19-35.

EGGE, J. K. and HEIMDAL, B. R., 1994. Blooms of phytoplankton including *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). Effects of nutrient supply in different N:P ratios. *Sarsia* **79**, 333-348.

EPPLEY, R. W., COATSWORTH, J. L., and SOLORZANO, L., 1969. Studies of Nitrate Reductase in Marine Phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **14**, 194-205.

EPPLEY, R. W., ROGERS, J. N., MCCARTHY, J. J., and SOURNIA, A., 1971. Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplanktons *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemostat culture. *Journal of Phycology* **7**, 150-154.

FALKOWSKI, P. G., BARBER, R. T., and SMETACEK, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* **281**, 200-206.

FEELY, R. A., SABINE, C. L., LEE, K., BERELSON, W., KLEYPAS, J., FABRY, V. J., and MILLERO, F. J., 2004. Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science* **305**, 362-366.

FERNÁNDEZ, E., BOYD, P., HOLLIGAN, P. M., and HARBOUR, D. S., 1993. Production of organic and inorganic carbon within a large-scale coccolithophore bloom in the northeast Atlantic Ocean. *Marine ecology progress series* **97** 271-285.

FIELD, C., BEHRENFELD, M., RANDERSON, J., FALKOWSKI, P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Component. *Science* **281**, 237

FITZ, J. J., 1999. Carbon fixation and coccolith detachment in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in nitrate-limited cyclostats. *Marine Biology* **133**, 509-518-518.

FITZ, J. J. and BALCH, W. M., 1996. A light-limited continuous culture study of *Emiliana huxleyi*: determination of coccolith detachment and its relevance to cell sinking. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **207**, 127-147.

FUJIWARA, S., TSUZUKI, M., KAWACHI, M., MINAKA, N., and INOUE, I., 2001. Molecular phylogeny of the Haptophyta based on the *rbcL* gene and sequence variation in the spacer region of the RUBISCO gene. *Journal of Phycology* **37**, 121-129.

GATTUSO, J. P., FRANKIGNOULLE, M., BOURGE, I., ROMAINE, S., and BUDDEMEIER, R. W., 1998. Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification. *Global and Planetary Change* **18**, 37-46.

GIORDANO, M., BEARDALL, J., and RAVEN, J. A., 2005. CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 99-131.

GRAN, H. H., 1912. Pelagic plant life. In: Murray, J. and Hjort, J. Eds.), *The depths of the ocean*. MacMillan and Co., London.

Gressel, J., 2008. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science* **174**, 246-263.

Groom, S. B. and Holligan, P. M., 1987. Remote sensing of coccolithophore blooms. *Advances in Space Research* **7**, 73-78.

Gruber, N. and Sarmiento, J. L., 1997. Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochem. Cycles* **11**, 235-266.

Herfort, L., Thake, B., and Roberts, J., 2002. Acquisition and use of bicarbonate by *Emiliana huxleyi*. *New Phytologist* **156**, 427-436.

Holligan, P. M., Viollier, M., Harbour, D. S., Camus, P., and Champagne-Philippe, M., 1983. Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge. *Nature* **304**, 339-342.

Hutchins, D. A., Fu, F. X., Zhang, Y., Warner, M. E., Feng, Y., Portune, K., Bernhardt, P. W., and Mulholland, M. R., 2007. CO₂ control of *Trichodesmium* N₂ fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnology and Oceanography* **52**, 1293-1304.

Iglesias-Rodriguez, M. D., Halloran, P. R., Rickaby, R. E. M., Hall, I. R., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J. R., Green, D. R. H., Tyrrell, T., Gibbs, S. J., von Dassow, P., Rehm, E., Armbrust, E. V., and Boessenkool, K. P., 2008. Phytoplankton Calcification in a High-CO₂ World. *Science* **320**, 336-340.

Jardillier, L., Zubkov, M. V., Pearman, J., and Scanlan, D. J., 2010. Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *The ISME Journal*, DOI: 10.1038/ismej.2010.36.

Kaplan, A. and Reinhold, L., 1999. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 539-570.

Klughammer, B., Sültemeyer, D., Badger, M. R., and Price, G. D., 1999. The involvement of NAD(P)H dehydrogenase subunits, NdhD3 and NdhF3, in high-affinity CO₂ uptake in *Synechococcus* sp. PCC7002 gives evidence for multiple NDH-1 complexes with specific roles in cyanobacteria. *Molecular Microbiology* **32**, 1305-1315.

Kranz, S. A., Sültemeyer, D., Richter, K.-U., and Rost, B., 2009. Carbon acquisition by *Trichodesmium*: the effect of pCO₂ and diurnal changes. *Limnology and Oceanography* **54**, 548-559.

Lane, T. W. and Morel, F. M. M., 2000. Regulation of Carbonic Anhydrase Expression by Zinc, Cobalt, and Carbon Dioxide in the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiology* **123**, 345-352.

Leclercq, N., Gattuso, J. P., and Jaubert, J., 2000. CO₂ partial pressure controls the calcification rate of a coral community. *Global Change Biology* **6**, 329-334.

Leonardos, N. and Geider, R. J., 2005. Elevated Atmospheric Carbon Dioxide Increases Organic Carbon Fixation by *Emiliana huxleyi* (Haptophyta), Under Nutrient-Limited High-Light Conditions. *Journal of Phycology* **41**, 1196-1203.

Levitan, O., Rosenberg, G., Setlik, I., Setlikova, E., Grigel, J., Klepetar, J., Prasil, O., and Berman-Frank, I., 2007. Elevated CO₂ enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Global Change Biology* **13**, 531-538.

Ludwig, M., Sültemeyer, D., and Price, G. D., 2000. Isolation of *ccmKLMN* genes from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 (cyanobacteria), and evidence that *ccmM* is essential for carboxysome assembly. *Journal of Phycology* **36**, 1109-1119.

Marsh, M. E., 2003. Regulation of CaCO₃ formation in coccolithophores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **136**, 743-754.

Milliman, J. D., 1993. Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean: Budget of a nonsteady state. *Global Biogeochem. Cycles* **7**, 927-957.

Miyachi, S., Iwasaki, I., and Shiraiwa, Y., 2003. Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high-CO₂ conditions. *Photosynthesis Research* **77**, 139-153.

Morse, J. W., Gledhill, D. K., and Millero, F. J., 2003. CaCO₃ precipitation kinetics in waters from the great Bahama bank: Implications for the relationship between bank hydrochemistry and whittings. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 2819-2826.

Morse, J. W. and Mackenzie, F. T., 1990. *The Geochemistry of sedimentary carbonates*. Elsevier (Amsterdam)

Morse, J. W., Millero, F. J., Thurmond, V., Brown, E., and Ostlund, H. G., 1984. The carbonate chemistry of Grand Bahama Bank waters: after 18 years another look. *Journal of Geophysical Research* **89**, 3604-3614.

Nielsen, M. V., 1995. Photosynthetic characteristics of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) exposed to elevated concentrations of dissolved inorganic carbon. *Journal of Phycology* **31**, 715-719.

Nimer, N. A., Guan, Q., and Merrett, M. J., 1994. Extra- and intra-cellular carbonic anhydrase in relation to culture age in a high-calcifying strain of *Emiliana huxleyi* Lohmann. *New Phytologist* **126**, 601-607.

Nimer, N. A. and Merrett, M. J., 1992. Calcification and utilization of inorganic carbon by the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* Lohmann. *New Phytologist* **121**, 173-177.

Obst, M., Wehrli, B., and Dittrich, M., 2009. CaCO₃ nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for a passive, surface-induced mechanism. *Geobiology* **7**, 324-347.

Omata, T., Price, G. D., Badger, M. R., Okamura, M., Gohta, S., and Ogawa, T., 1999. Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13571-13576.

Paasche, E., 1964. A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi*. *Physiologia Plantarum Suppl.* **3**, 1-82.

Paasche, E., 1998. Roles of nitrogen and phosphorus in coccolith formation in *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *European Journal of Phycology* **33**, 33-42.

Paasche, E., 2001. A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* **40**, 503-529.

Paasche, E. and Brubak, S., 1994. Enhanced calcification in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) under phosphorus limitation. *Phycologia* **33**, 324-330. .

Papazi, A., Makridis, P., Divanach, P., and Kotzabasis, K., 2008. Bioenergetic changes in the microalgal photosynthetic apparatus by extremely high CO₂ concentrations induce an intense biomass production. *Physiologia Plantarum* **132**, 338-349.

Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J., and Long, B. M., 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1441-1461.

Price, G. D., Maeda, S.-i., Omata, T., and Badger, M. R., 2002. Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Functional Plant Biology* **29**, 131-149.

Quiroga, O. and González, E. L., 1993. Carbonic anhydrase in the chloroplast of a coccolithophorid (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology* **29**, 321-324.

Raven, J. A. and Beardall, J., 2003. Carbon acquisition mechanisms in algae: carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms. In: Larkum, A., Douglas, S., and Raven, J. Eds.), *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: Dordrecht.

Richardson TL. and Jackson GA. 2007. Small Phytoplankton and Carbon Export from the Surface Ocean. *Science* **315**, 838-840.

Riding, R., 2006. Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic-Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology* **4**, 299-316.

Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P. D., Zeebe, R. E., and Morel, F. M. M., 2000. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* **407**, 364-367.

Riegman, R., Stolte, W., Noordeloos, A. A. M., and Slezak, D., 2000. Nutrient uptake and alkaline phosphatase (ec 3:1:3:1) activity of emiliana huxleyi (Prymnesiphyceae) during growth under n and p limitation in continuous cultures. *Journal of Phycology* **36**, 87-96.

Ritchie, R. J., Nadolny, C., and Larkum, A. W. D., 1996. Driving Forces for Bicarbonate Transport in the Cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (PCC 7942). *Plant Physiology* **112**, 1573-1584.

Robbins, L. L., Tao, Y., and Evans, C. A., 1997. Temporal and spatial distribution of whittings on Great Bahama Bank and a new lime mud budget. *Geology* **25**, 947-950.

Roberts, K., Granum, E., Leegood, R. C., and Raven, J. A., 2007. C3 and C4 pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control. *Plant Physiology* **145**, 230-235.

Rost, B., Riebesell, U., Burkhardt, S., and Sultemeyer, D., 2003. Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **48**, 55-67.

Sekino, K., Kobayashi, H., and Shiraiwa, Y., 1996. Role of Coccoliths in the Utilization of Inorganic Carbon by a Marine Unicellular Coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*: a Survey Using Intact Cells and Protoplasts. *Plant and Cell Physiology* **37**, 123-127.

Sekino, K. and Shiraiwa, Y., 1994. Accumulation and Utilization of Dissolved Inorganic Carbon by a Marine Unicellular Coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*. *Plant and Cell Physiology* **35**, 353-361.

Sekino, K. and Shiraiwa, Y., 1996. Evidence for the Involvement of Mitochondrial Respiration in Calcification in a Marine Coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*. *Plant and Cell Physiology* **37**, 1030-1033.

Shiraiwa, Y., 2003. Physiological regulation of carbon fixation in the photosynthesis and calcification of coccolithophorids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **136**, 775-783.

Shutler, J. D., Grant, M. G., Miller, P. I., Rushton, E., and Anderson, K., 2010. Coccolithophore bloom detection in the north east Atlantic using SeaWiFS: Algorithm description, application and sensitivity analysis. *Remote Sensing of Environment* **114**, 1008-1016.

Sikes, C. S., Roer, R. D., and Wilbur, K. M., 1980. Photosynthesis and Coccolith Formation: Inorganic Carbon Sources and Net Inorganic Reaction of Deposition. *Limnology and Oceanography* **25**, 248-261

Sikes, C. S. and Wheeler, A. P., 1982. Carbonic anhydrase and carbon fixation in coccolithophorids. *Journal of Phycology* **18**, 423-426.

Smith, K. S. and Ferry, J. G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 335-366.

Sorrosa, J., Satoh, M., and Shiraiwa, Y., 2005. Low Temperature Stimulates Cell Enlargement and Intracellular Calcification of Coccolithophorids. *Marine Biotechnology* **7**, 128-133.

Sültemeyer, D., 1998. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis. *Canadian journal of botany* **76**, 962-972.

Tchernov, D., Silverman, J., Luz, B., Reinhold, L., and Kaplan, A., 2003. Massive light-dependent cycling of inorganic carbon between oxygenic photosynthetic microorganisms and their surroundings. *Photosynthesis Research* **77**, 95-103-103.

Thierstein, H. R., Geitzenauer, K. R., Molfino, B., and Shackleton, N. J., 1977. Global synchronicity of late Quaternary coccolith datum levels Validation by oxygen isotopes. *Geology* **5**, 400-404.

Thompson, J. B., 2000. Microbial whittings. In: Riding, R. and Awramik, S. M. Eds.), *Microbial Sediments*. Springer, Verlag, Berlin.

Thompson, J. B. and Ferris, F. G., 1990. Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water. *Geology* **18**, 995-998.

Thompson, J. B., Schultze-Lam, S., Beveridge, T. J., and Des Marais, D. J., 1997. Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography* **42**, 133-141.

Tsuzuki, M. and Miyachi, S., 1990. Transport and fixation of inorganic carbon in photosynthesis of cyanobacteria and green algae. *Bot. Mag. Tokyo Special Issue 2*, 43-52.

Van der Wal, P., Kempers, R. S., and Veldhuis, M., 1995. Production and downward flux of organic matter and calcite in a North Sea bloom of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Marine Ecology Progress Series* **126**, 247-265.

Zondervan, I., Rost, B., and Riebesell, U., 2002. Effect of CO₂ concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **272**, 55-70.

Zuddas, P. and Mucci, A., 1998. Kinetics of Calcite Precipitation from Seawater: II. The Influence of the Ionic Strength. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **62**, 757-766.

CONFIDENTIAL

Figure Captions

Figure 1: Model of the carbon-concentrating mechanism (CCM) and calcification in cyanobacterial cell. EPS = exopolysaccharide sheath; NDH = NADPH dehydrogenase and PET = photosynthetic electron transport. (modified from Riding, 2006).

Figure 2: Inorganic carbon used by *Emiliana huxleyi* for photosynthesis and calcification. (according to Buitenhuis et al., 1999).

Figure 3: Model of DIC utilization for photosynthesis and calcification in the coccolithophorid *E huxleyi* (Shiraiwa, 2003)

CONFIDENTIAL

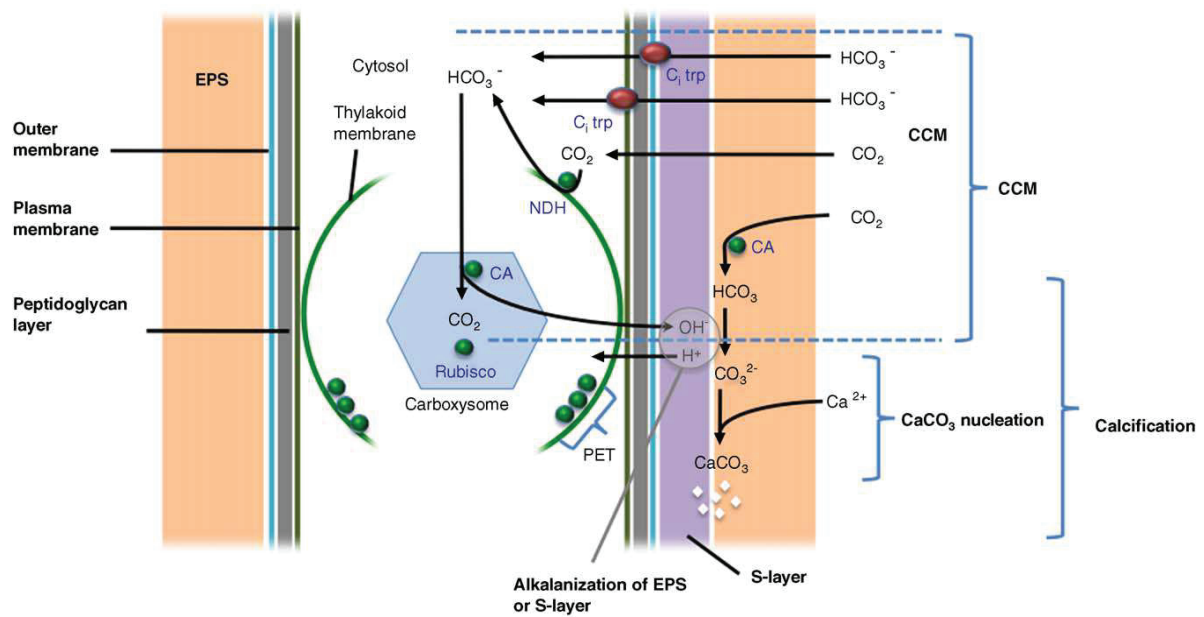


Figure 1: Model of the carbon-concentrating mechanism (CCM) and calcification in cyanobacterial cell. EPS = exopolysaccharide sheath; NDH = NADPH dehydrogenase and PET = photosynthetic electron transport. (modified from Riding, 2006).

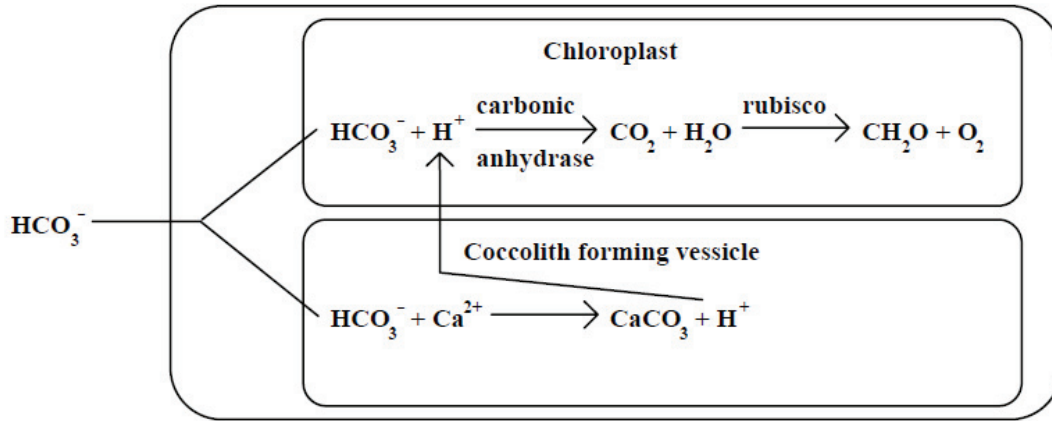


Figure 2: Inorganic carbon used by *Emiliana huxleyi* for photosynthesis and calcification. (according to Buitenhuis et al., 1999).

CONFIDENTIAL

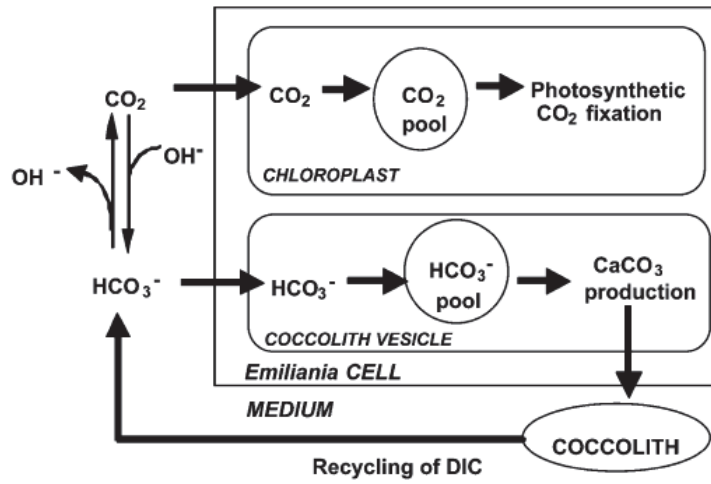


Figure 3: Model of DIC utilization for photosynthesis and calcification in the coccolithophorid *E huxleyi* (Shiraiwa, 2003)

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIEL

3 Matériel et Méthodes

3.1 Analyses chimiques

3.1.1 Dosage des ions

Les dosages des ions (anions et cations) dans les milieux de culture sont effectués par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette méthode est utilisée pour quantifier le magnésium, le calcium, le nitrate et le nitrite. Le sodium, le potassium, le chlorure, le sulfate et le phosphate sont détectés mais non quantifiés.

L'appareillage utilisé est une chaîne HPLC ICS-3000 de chez DIONEX. L'HPLC ionique est équipée d'un passeur d'échantillon, d'une pompe, d'une enceinte thermostatée, d'un suppresseur et d'une détection par conductimétrie. L'HPLC est équipée d'un générateur d'éluant et d'un suppresseur électrique. L'utilisation d'un générateur d'éluant et d'un suppresseur électrique évite de préparer les diverses solutions (éluant, solution de lavage...), seule de l'eau déionisée (résistivité 18M Ω /cm) est nécessaire. Le logiciel "Chromeleon" est utilisé pour piloter l'appareillage et traiter les données.

Les échantillons à analyser sont impérativement filtrés sur un filtre PTFE avec un seuil de coupure de 0,45 μ m. Avant analyse, les échantillons sont conditionnés dans des flacons en verre munis de bouchons avec septum téflon, et conservés à 4°C. Des dilutions sont faites juste avant analyse pour se situer dans la gamme d'étalonnage des standards. Les solutions standards (pour l'établissement d'une gamme étalon) sont également conditionnées dans des flacons en verre munis de bouchons avec septum téflon, et conservés à -20°C.

NB: Pour l'analyse des cations, après la filtration, les échantillons sont acidifiés en ajoutant de l'H₂SO₄ (2N) à raison de 1% du volume d'échantillon.

3.1.1.1 Dosage des cations

Les échantillons sont analysés sur une colonne présentant des groupements fonctionnels du type acide carboxylique. La colonne est ainsi chargée négativement pour retenir spécifiquement les cations. Ceux-ci sont élués par l'acide méthane-sulfonique. Les ions sont séparés selon leur charge. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Volume d'injection	25 μ L (boucle d'injection)
- Pré Colonne DIONEX	IonPac CG12A 4 mm x 50 mm
- Colonne DIONEX	IonPac CS12A 4 mm x 250 mm
- Éluant Acide	Méthanesulfonique à 20mM
- Débit éluant	1 ml/mm
- Température colonne	25°C
- Suppresseur	CSRS-ULTRA (4mm) auto régénérant
- Courant du supprimeur	100mA
- Détecteur	Conductimètre
- Durée d'analyse	20 minutes

Les cations sont identifiés sur la base du temps de rétention, par comparaison avec des standards. Un exemple de séparation de cations est présenté dans la Figure 10.

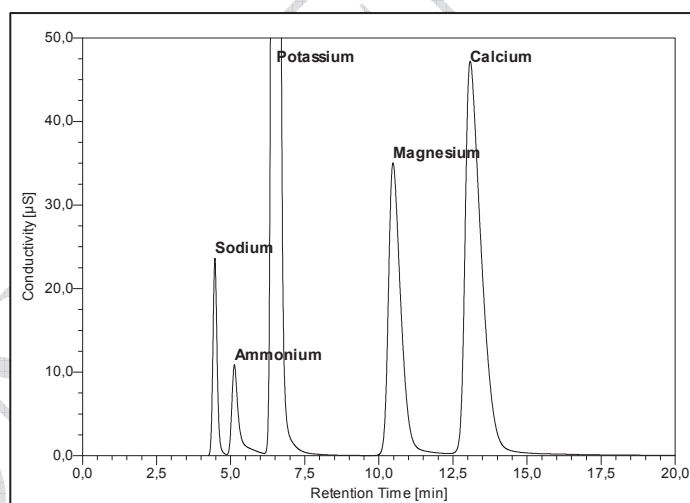


Figure 10 : Chromatogramme de séparation des cations en HPLC ionique.

La quantification est faite en standard externe. Les gammes étalons ont été établies pour le magnésium et le calcium, respectivement entre 0 et 1000 et 0 et 400 μ M. Les différents points de la gamme étalon sont préparés à partir de deux solutions mères de MgO (6,25 mM) et CaCO₃ (2,5 mM). Différents volumes de la solution mère sont introduits dans un milieu salin proche d'un point de vue compositionnel du milieu de culture des cyanobactéries.

Les courbes d'étalonnage sont validées pour un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,998 (Figure 11 et Figure 12).

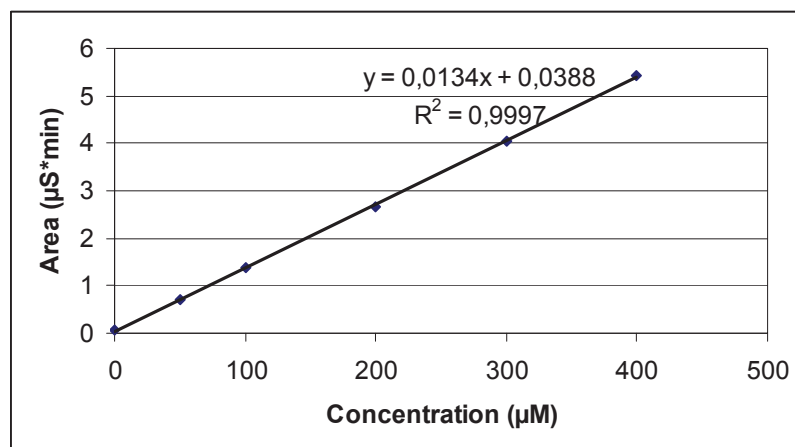


Figure 11 : Courbe d'étalonnage pour le calcium

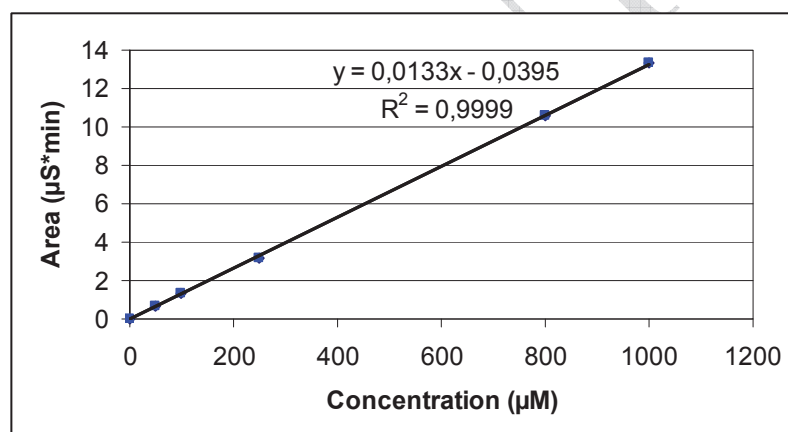


Figure 12 : Courbe d'étalonnage pour le magnésium.

3.1.1.2 Dosage des anions

Les échantillons sont analysés sur une colonne présentant des groupements fonctionnels "*alkyl/alkanol quaternary ammonium*". La colonne est ainsi chargée positivement pour retenir spécifiquement les anions. Ceux ci sont élués par de la potasse. Les ions sont séparés selon leur charge. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Volume d'injection	25µL (boucle d'injection)
- Pré Colonne DIONEX	IonPac AG9-HC, 4 mm x 50 mm
- Colonne DIONEX	IonPac AS9-HC, 4 mm x 250 mm
- Éluant	Potasse
- Gradient d'élution :	
0 - 10 minutes	Potasse à 20 mM
10 - 25 minutes	Gradient de 20 à 45mM
25 - 25,1 minutes	Gradient de 45 à 20mM
25,1 - 30 minutes	Potasse 20mM
- Débit éluant	1 ml/mm
- Température colonne	30°C
- Suppresseur	ASRS-ULTRA (4mm) auto régénérant
- Courant du supprimeur	150mA
- Détecteur	Conductimètre
- Temps d'analyse	30 minutes

Les anions sont identifiés sur la base du temps de rétention, par comparaison avec des standards. Un exemple de séparation des anions est présenté dans la Figure 13.

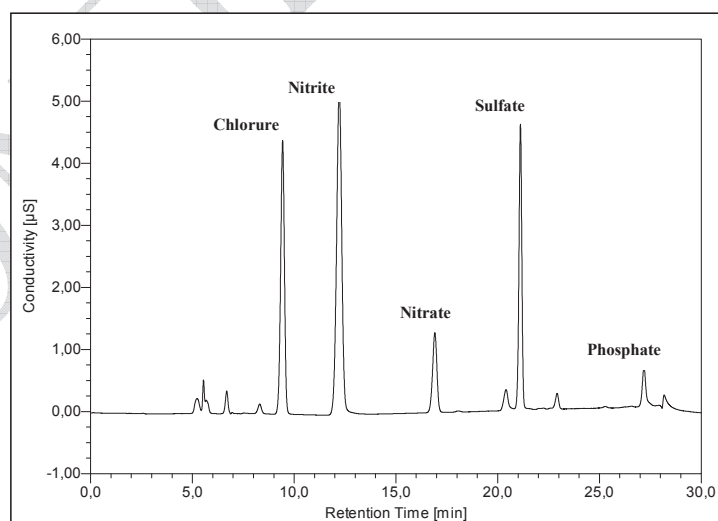


Figure 13 : Chromatogramme de séparation des anions en HPLC ionique.

La quantification est faite en standard externe. Les gammes étalons ont été établies pour le nitrate et le nitrite, entre 0 et 2,5 mM. Les différents points de la gamme étalon sont préparés à partir de NaNO_3 et NaNO_2 . La courbe d'étalonnage du nitrate est une équation

linéaire (type $y = ax + b$), celle du nitrite est polynomiale d'ordre 2 (équation du second degré). Les courbes d'étalonnage sont validées pour un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,998 (Figure 14 et Figure 15).

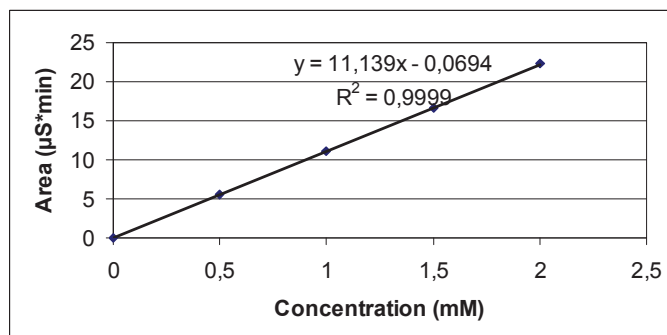


Figure 14 : Courbe d'étalonnage du nitrate

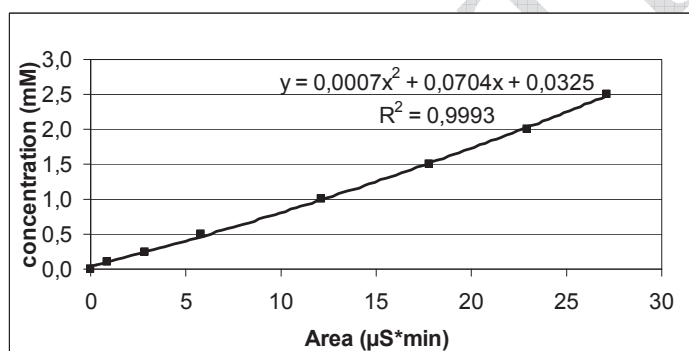


Figure 15 : Courbe d'étalonnage du nitrite

3.1.2 Dosage de Ca^{2+} dissous dans l'eau par absorption atomique

Les analyses d'absorption atomique sont réalisées par ICP-AES. Une gamme étalon de la solution saline est faite avec différents teneurs de Ca^{2+} (0, 10, 20, 50 et 100 ppm).

Les analyses d'ICP-AES sont effectuées sur les échantillons dilués au dixième. Le milieu de culture est filtré et puis conservé à 4°C dans un tube en polypropylène de 10 ml (Ref VWR 216-0154).

3.1.3 Dosage du CT (carbone total), du CI (carbone inorganique) et du COD (carbone organique dissous).

Par convention le carbone sous forme organique est écrit sous le sigle COD, et le carbone minéral sous le sigle CI. La somme des deux formes représente le carbone total (CT). Le dosage des deux formes de carbone (minéral et organique) est fait sur un analyseur TOC 5050 Shimadzu. Cet analyseur permet de mettre en œuvre séparément une analyse de CT et une analyse de CI sur deux lignes d'analyse différentes. La limite de détection est de 50 ppb à 4,000 ppm pour la ligne CT et de 50 ppb à 5,000 ppm pour la ligne CI.

Chaque échantillon (standard ou essai) est analysé systématiquement sur les deux lignes d'analyses.

L'analyse du carbone total (organique et minéral) est faite sur une première ligne d'analyse (ligne CT) dans laquelle le carbone organique et minéral (éventuellement sous la forme de bicarbonate et de carbonate) est décomposé en CO_2 dans un tube à combustion, en présence d'un catalyseur à palladium porté à 680°C . Le volume maximal d'injection est de 100 μl .

L'analyse du carbone minéral est faite sur la seconde ligne d'analyse (ligne CI), où le carbone minéral est traité en présence d'acide ortho-phosphorique (20%), qui permet le déplacement total de ce carbone minéral de l'échantillon liquide sous la forme de CO_2 . Le volume maximal d'injection est de 250 μl . Pour les deux lignes d'analyse, le CO_2 généré (dilué dans un gaz vecteur qui est de l'air sans CO_2) est mesuré par infrarouge.

Par convention le carbone organique dissous est obtenu en soustrayant la valeur de carbone minéral de la valeur du carbone total ($\text{COD} = \text{CT} - \text{CI}$). Les valeurs de carbone organique sont donnés en équivalent hydrogénéphthalate. Pour quantifier très correctement la réponse "carbone organique" de l'échantillon, il serait nécessaire de connaître la nature des composés organiques présents (proportion C/CONHS).

3.1.3.1 Calibration de la ligne CT et CI

La ligne d'analyse CT est calibrée avec de l'hydrogénéphthalate de potassium ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$). Deux gammes de calibration sont effectuées. Les gammes de calibration sont présentées dans le Tableau 2. Les courbes de calibration sont présentées dans la Figure 16. Les standards de calibration sont préparés dans de l'eau filtrée à 0,22 μm et de résistivité de 18 Ωm .

Tableau 2 : Gamme de calibration pour la ligne d'analyse CT

Gamme de calibration	Volume d'injection μl	C introduit	
		μM	mg/L
N°1	27	1	0
		2	417
		3	833
		4	4167
		5	8333
N°2	16	1	0
		2	8333
		3	20833
		4	41667
		5	83333

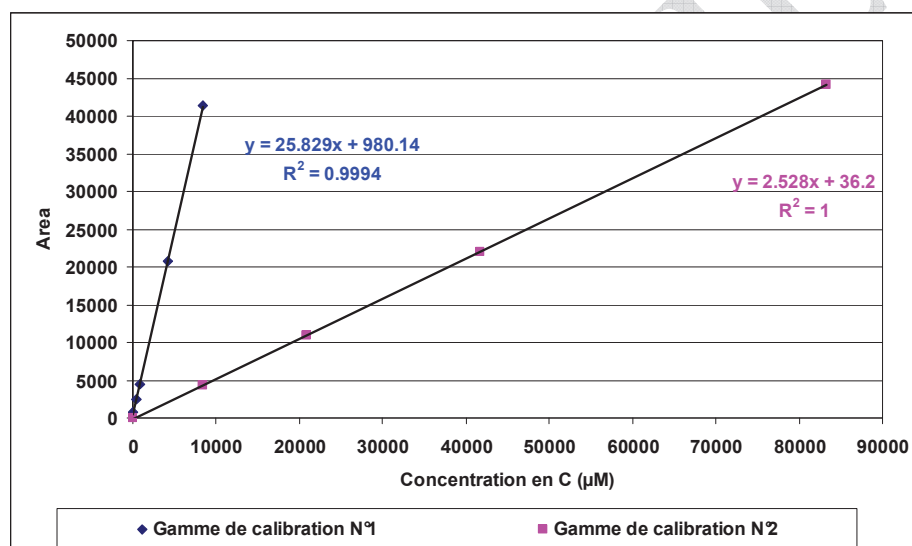


Figure 16 : Courbe de calibration pour la ligne d'analyse CT

La ligne d'analyse CI est calibrée avec des standards préparés avec du NaHCO_3 et du Na_2CO_3 . Les standards sont préparés à partir d'une solution mère (500 mg/l en carbone total) qui contient de 50% de carbone issu de NaHCO_3 et 50% de carbone issu de Na_2CO_3 , dans de l'eau MilliQ filtrée à 0,22 μm, et de résistivité de 18 Ωm. Le carbonate de sodium est chauffé pendant 1 heure à 285 °C et refroidi dans un dessiccateur avant la fabrication de la solution mère.

Trois gammes de calibration sont effectuées. Les gammes de calibration sont présentées dans le Tableau 3. Les courbes de calibration sont présentées dans la Figure 17.

Tableau 3 : Gamme de calibration pour la ligne d'analyse CI

Gamme de calibration	Volume d'injection µl	C introduit		
			µM	mg/L
N°1	27	1	0	0
		2	417	5
		3	833	10
		4	2083	25
N°2	13	1	0	0
		2	2083	25
		3	4167	50
		4	8333	100
N°3	33	1	0	0
		2	8333	100
		3	20833	250
		4	41667	500

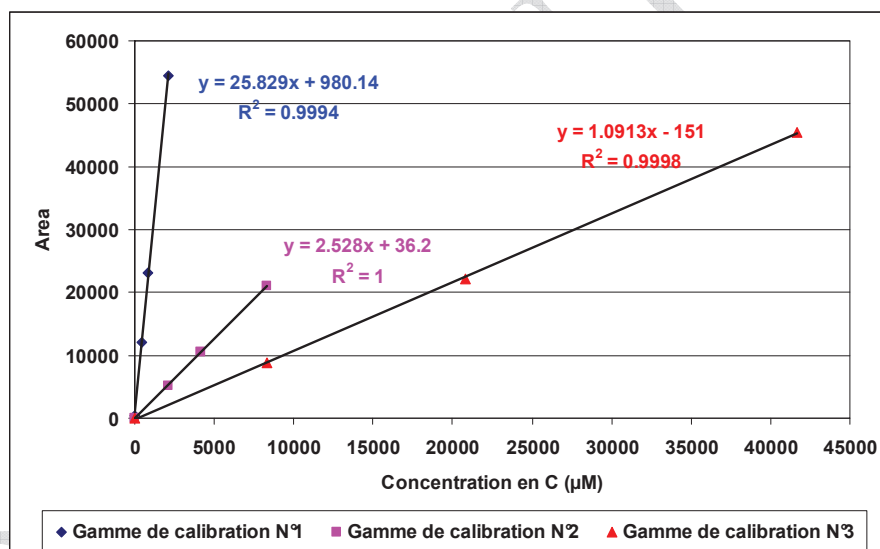


Figure 17 : Courbe de calibration pour la ligne d'analyse CI

Pour prendre en compte une interférence possible d'une charge en sel (dans les milieux de culture à analyser) on a comparé la réponse de deux gammes d'étalonnage. L'une est faite avec le milieu pour la croissance des cyanobactéries et l'autre avec l'eau MilliQ. Pour ces deux gammes d'étalonnage, l'apport du carbone minéral a été fait par du bicarbonate de sodium. La molarité varie de 0,25 mM à 8 mM. On traite les différents points de cette gamme d'étalonnage comme des échantillons à analyser.

La réponse du carbone minéral est mesurée à la fois par la ligne CI et la ligne CT. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Les réponses de carbone minéral étaient comparables par les deux lignes d'analyses CT et CI. La salinité du milieu (de l'ordre de 15g/l)

n'as pas d'incidence sur la mesure du carbone minéral. Les réponses des points de chaque gamme (dans l'eau et dans le milieu marin) sont alignées sur des droites (avec des équations de type: $y = ax + b$) avec un coefficient de corrélation (R^2) supérieur à 0,999.

NB : Dans le cas où l'échantillon ne présente que du carbone organique dissous, on a vérifié que la réponse de la ligne d'analyse CI était nulle.

Une étude de répétabilité des réponses de la ligne d'analyse CI a été également faite en passant dix fois un même échantillon ne contenant que du carbone minéral. L'échantillon testé est préparé dans un milieu salin (cf. §3.2.2), avec une concentration en carbone minéral de 7,5 mM (HCO_3^-) et avec une concentration de chlorure de calcium de 3,4 mM. On obtient une réponse moyenne de 7,3 mM, avec un écart-type dans l'ordre de 0,1 (1,37 % de la valeur).

Tableau 4 : Réponses des lignes CT et CI pour les échantillons ne contenant que du carbone minéral

		Carbone minéral introduit mM	Réponse ligne CT mM	Réponse ligne CI mM
Eau MilliQ + NaHCO_3				
	N°1	0,25	0,4	0,3
	N°2	0,50	0,6	0,6
	N°3	1,00	1,1	1,1
	N°4	1,50	1,6	1,6
	N°5	2,00	2,0	2,0
	N°6	4,00	4,0	4,0
	N°7	6,00	5,9	6,0
	N°8	8,00	8,0	8,1
Milieu marin + NaHCO_3				
	N°1	0,25	0,4	0,3
	N°2	0,50	0,6	0,5
	N°3	1,00	1,0	1,1
	N°4	1,50	1,5	1,6
	N°5	2,00	2,0	2,0
	N°6	4,00	4,0	4,2
	N°7	6,00	6,0	6,1
	N°8	8,00	7,8	8,1

3.1.3.2 Dosage du carbone minéral et organique des échantillons

L'analyse du carbone minéral et organique est faite sur les échantillons filtrés sur filtre PTFE avec un seuil de coupure de 0,45 μm (filtre FH, Millipore). Cette filtration permet de séparer la "matière insoluble" (biomasse seule ou mélange biomasse/carbonate de calcium). Les filtrats obtenus sont conservés à +4 °C dans des tubes plastiques (ref VWR 216-0154) de 10 mL remplis totalement et fermés avec un bouchon étanche pour éviter des échanges avec

l'atmosphère. Les échantillons ne sont jamais dilués afin d'éviter une perte possible de carbone minéral par modification de pH du à la dilution entraînant un rééquilibrage des formes des espèces du système carbonate.

L'échantillon est injecté avec un passeur automatique et le calculateur de l'appareillage sélectionne une réponse optimale en variant automatiquement le volume d'injection.

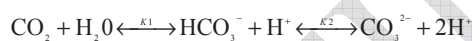
Des standards sont intercalés au cours de l'analyse des échantillons pour vérifier la calibration des deux lignes d'analyse: la ligne CT est contrôlée avec le standard CT 100 mg/L (soit 8333 μ M), la ligne CI est contrôlée avec le standard CI 50 mg/L (soit 4167 μ M).

3.1.4 Dosage des espèces hydroxyles, carbonate et hydrogénocarbonate dans l'eau

3.1.4.1 Définition du système "carbonate"

Dans les eaux (eau douce et eau de mer), le carbone minéral existe sous trois formes inorganiques : le CO₂ libre (CO₂ aq), le bicarbonate (HCO₃⁻), et le carbonate (CO₃²⁻). Une quatrième forme est la forme H₂CO₃ (acide carbonique) qui est négligeable du point de vue quantitatif.

L'ensemble des espèces carbonatées est représenté par l'équilibre suivant:



où K₁ et K₂ sont les deux constantes d'équilibres, souvent appelées respectivement première et seconde constantes de l'acide carbonique.

Dans les eaux de mer, la distribution des trois espèces : CO₂ dissous, bicarbonate et carbonate est donnée dans la

Figure 18, telle que présentée par Bjerrum (Zeebe et Wolf-Gladrow, 2001¹). A la valeur de la première dissociation (pK₁ = 5,86, valeur pour l'eau de mer), la concentration de l'espèce CO₂ est égale à la concentration de l'espèce HCO₃⁻. A la valeur de la seconde dissociation (pK₂ = 8,92, valeur pour l'eau de mer), la concentration de l'espèce HCO₃⁻ est égale à la concentration de l'espèce CO₃²⁻. (NB: les concentrations sur l'axe des ordonnées sont données en échelle logarithmique)

¹ Zeebe Re, Wolf-Gladrow Da (2001) *CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

NB : Les milieux naturels, type eaux douces ou eaux de mer, présentent rarement des situations de pH extrême, en particulier de pH fortement alcalin. A l'inverse dans nos cultures, des pH alcalins peuvent être obtenus. Dans ces conditions la teneur en ions hydroxyle présents est prise en compte.

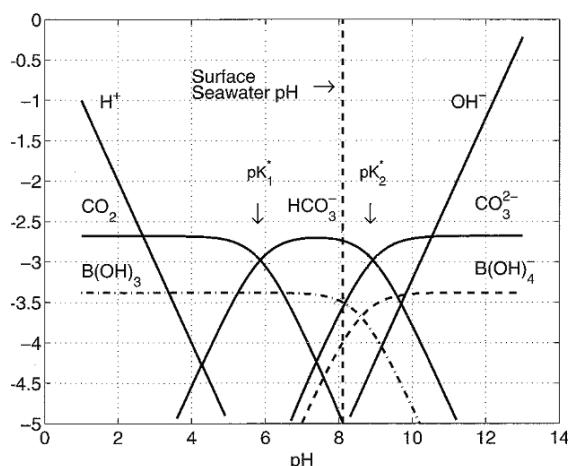


Figure 18 : Le système carbonaté dans l'eau de mer (Zeebe et Wolf-Gladrow, 2001).

3.1.4.2 Principe

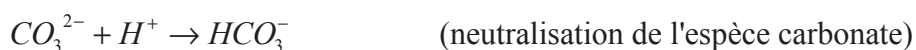
La quantification des trois espèces hydroxyle, carbonate et bicarbonate est faite par la technique de "titrimétrie". On prend en compte les espèces hydroxyle et carbonate dans des échantillons fortement alcalins. Pour des échantillons moins alcalin, on prend seulement en compte les espèces carbonate et bicarbonate.

3.1.4.3 Méthodologie

La titrimétrie s'effectue à l'aide d'un acide fort de normalité connue. On détermine la courbe : quantité de H^+ (abscisse)/pH (en ordonnée). La Figure 19 représente un exemple de courbe de titrimétrie pour une situation où les deux espèces carbonate et bicarbonate sont présentes respectivement à $50 \mu\text{mol}$ de NaHCO_3 et $50 \mu\text{mol}$ de Na_2CO_3 .

Le premier point d'inflexion (noté point d'inflexion 1 dans la Figure 19) correspond au virage de la phénolphthaléine ($\text{pH} < 8,3$ incolore et $\text{pH} > 8,3$ rose). Les protons H^+ se combinent aux ions hydroxyle et aux ions carbonate. Les ions carbonate forment des ions bicarbonate. La quantité d'acide ajoutée pour atteindre le point d'inflexion 1 (exprimée en équivalent $\mu\text{mol } H^+$) permet de calculer "l'alcalinité phénolphthaléine" (notée Phe Alc).





Le second point d'inflexion (noté point d'inflexion 2 dans la Figure 19) correspond au virage d'un indicateur mixte vert de bromocrésol ($\text{pH} < 3,6/5,2$ jaune et $\text{pH} > 3,6/5,2$ vert) - rouge de méthyle ($\text{pH} < 4,2/6,3$ rouge et $\text{pH} > 4,2/6,3$ jaune). Les protons H^+ se combinent aux ions bicarbonate pour former du CO_2 . Par convention, "l'alcalinité totale" (notée AT) représente la quantité totale d'acide ajoutée depuis le départ de la titration pour atteindre le point d'inflexion 2.

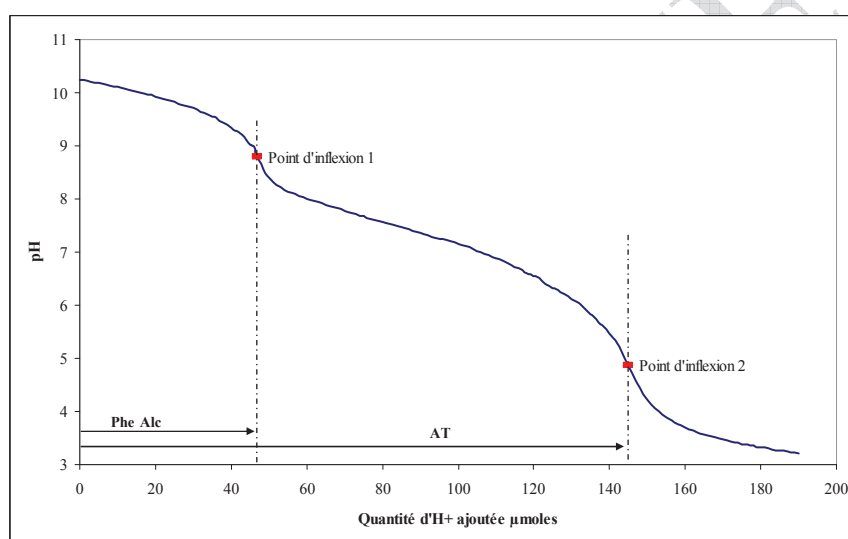


Figure 19 : Courbe de titrimétrie : 50 μmol de NaHCO_3 et 50 μmol de Na_2CO_3 .

Les espèces hydroxyle, carbonate et bicarbonate sont déterminées à partir de ces deux alcalinités (Phe Alc et AT). On utilise les formules de calcul présentées dans le Tableau 5 tenant compte de 5 situations possibles. La situation 4 représente une situation où ne coexistent que les deux espèces carbonate et bicarbonate. Dans ces conditions $\text{Phe Alc} < \text{AT}/2$, quelque soit le rapport entre les deux espèces carbonate et bicarbonate.

Dans le Tableau 5, on définit l'*alcalinité carbonate* comme suit : $2[\text{CO}_3^{2-}]$. On définit l'*alcalinité bicarbonate* comme suit : $[\text{HCO}_3^-]$.

NB : Attention ces alcalinité carbonate et bicarbonate du Tableau 5 n'ont rien à voir avec la notion d'alcalinité carbonate désignée sous le sigle CA définie comme suit : $\text{CA} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}]$. Cette alcalinité carbonate est une grandeur mesurable qui ne dépend pas du pH. Son grand mérite est de représenter, en quelque sorte, la résistance chimique de l'eau

vis-à-vis d'une perturbation acido-basique via le maintien de la neutralité électrique de l'eau (on parle de "*pouvoir tampon*").

Tableau 5 : Différentes situations de distribution des alcalinités avec les ions carbonate, bicarbonate et OH⁻

Situations	Titration	Alcalinité Hydroxyle	Alcalinité Carbonate	Alcalinité Bicarbonate
1	Phe Alc = AT	= Total Alcalinité	0	0
2	Phe Alc > AT/2	= 2Phe Alc - AT	= 2(AT-Phe Alc)	0
3	Phe Alc = AT/2	0	= AT	0
4	Phe Alc < AT/2	0	= 2 Phe Alc	= AT-2Phe Alc
5	Phe Alc = 0	0	0	= AT

3.1.4.4 Mode opératoire

La titration est faite avec un titrimètre automatique (Titrimo 702 SM, METHROM). Les paramètres habituels de titration sont :

- volume d'échantillon de l'ordre de 40 ml (volume mesuré)
- acide sulfurique 0,01N.

La titration automatique se fait par des ajouts fixes de 0,1 ml (ce qui correspond à 1 $\mu\text{mol H}^+$ pour une normalité de 0.01N). Les mesures sont enregistrées sur ordinateur à l'aide d'un logiciel (Tiamo, METHROM). Les données sont ensuite traitées sur Excel pour déterminer précisément les deux points d'inflexion.

Sur la courbe de titration, les points d'inflexion sont positionnés précisément pour la variation maximale de pH obtenue pour un ajout fixe de H⁺ (de 1 $\mu\text{mol H}^+$). Le point final de la titration est fixé autour de pH 3.

3.1.4.5 Répétabilité, limite de quantification, influence de la salinité

La répétabilité de la méthode de titrimétrie a été déterminée sur 10 titrations d'un même échantillon. La prise d'essai est de 40 ml (ce qui correspond à 50 μmol de CO_3^{2-} et 50 μmol d' HCO_3^-). Les valeurs moyennes obtenues sont respectivement de 50 μmol pour le CO_3^{2-} et de 48 μmol pour le HCO_3^- , avec des écart-types respectifs de 1 et 2 μmol .

La limite de détection a également été évaluée. Pour cela une prise d'essai de 4 ml (échantillon avec 5 μmol de CO_3^{2-} et 5 μmol d' HCO_3^-) a été utilisée.

Les valeurs moyennes obtenues sont respectivement de 4,7 μmol pour le CO_3^{2-} et de 5,2 μmol pour le HCO_3^- , avec des écart-types respectifs de 0,3 et 0,4 μmol .

L'influence de la salinité sur le dosage des carbonates et des bicarbonates par titrimétrie a été examinée. Deux solutions de bicarbonate à 5 mM, l'une dans de l'eau, l'autre dans du milieu salin (à 15 g/L) ont été dosées. Les courbes de titration dans la Figure 20 montrent qu'une salinité de l'ordre de 15 g/L n'a pas d'incidence sur les résultats de la titration.

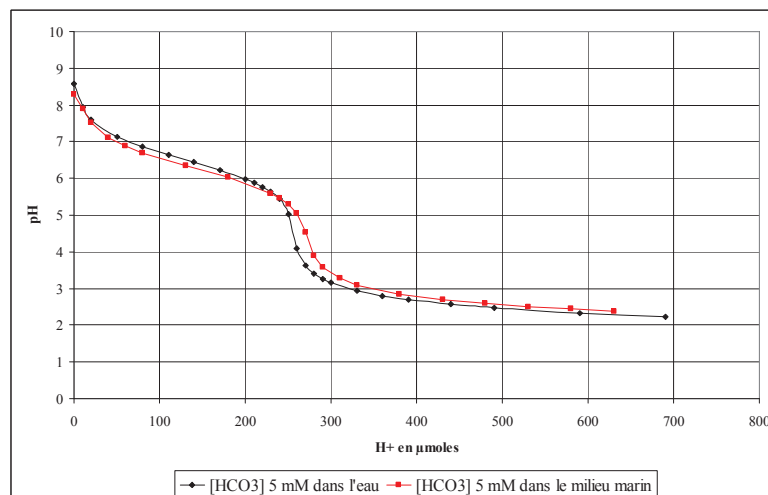


Figure 20: Influence de la salinité sur la titration des espèces carbonate et bicarbonate

3.1.5 Dosage du CO₂ et d'O₂ gazeux par CPG

La teneur en CO₂ et en O₂ de la phase gazeuse (ciel de la fiole d'essai) est mesurée en chromatographie gazeuse (CPG) avec un chromatographe muni de deux injecteurs, et d'un four commun. La détection se fait par catharométrie. Le détecteur est unique et les deux colonnes sont raccordées par un Y au catharomètre. L'acquisition des réponses chromatographiques est faite avec un logiciel informatique Borwin (VARIAN).

3.1.5.1 Analyse du CO₂

Le dosage de la teneur en CO₂ (%v/v) dans l'échantillon gazeux se fait sur une colonne inox remplie, de 2 mm de diamètre interne et de 2m de longueur. La phase est le support Porapak Q (80/100 mesh) (fournisseur Chrompack). Le gaz vecteur est l'hélium. La pression en tête de colonne est de 25 psi, ce qui correspond à un débit de 30 ml/min en sortie de colonne. L'analyse s'effectue en isotherme. La température du four est de 100 °C. La température de l'injecteur est de 130°C. La température du détecteur (TCD) est de 130°C. La température de filament du pont de Wheatstone est de 180°C, pour un courant de filament de 180 mA. La polarité est réglée pour obtenir une réponse sous la forme d'un signal positif. Sur le CPG, la "polarité" est positionnée sur positif pour l'analyse de CO₂.

Dans ces conditions d'analyses, l'azote et le CO₂ sont détectés. L'azote sort à environ 0,25 min et le CO₂ à environ 0,45 min. On observe un pic d'eau à environ 1,05 min (cf. Figure 21). Il est nécessaire de laisser sortir le pic d'eau avant une nouvelle analyse.

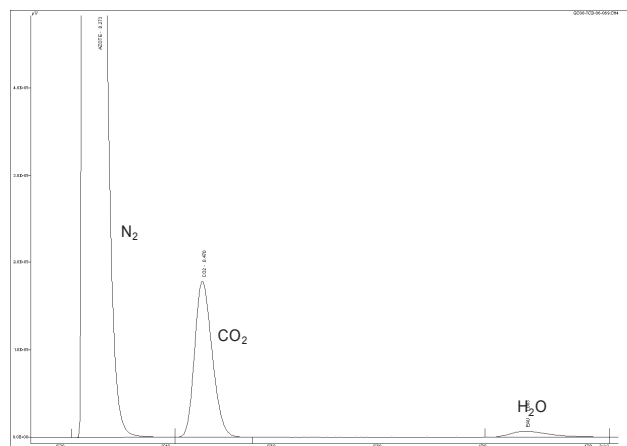


Figure 21 : Réponse catharométrique: azote, CO₂, et eau.

3.1.5.2 Analyse de l'O₂

Le dosage de la teneur en O₂ dans l'échantillon gazeux se fait sur une colonne inox remplie, de 2 mm de diamètre interne et de 2 m de longueur. La phase est un tamis moléculaire 13X (80/100 mesh) (fournisseur Altech). Cette phase a subi des lavages pour éliminer les fines et améliorer la réponse. Le gaz vecteur est de l'hélium. La pression en tête de colonne est de 42 psi qui correspond à un débit de 30 ml/min en sortie de colonne. L'analyse s'effectue en isotherme. La température du four est de 50°C. La température de l'injecteur est de 130°C. La température du détecteur (TCD) est de 130°C. La température de filament du pont de Wheatstone est de 180°C, avec un courant de filament de 180 mA. La polarité est réglée pour obtenir une réponse sous la forme d'un signal positif. Sur le CPG, la "polarité" est positionnée sur négatif pour l'analyse de l'O₂.

Dans ces conditions d'analyses, l'oxygène et l'azote sont détectés. L'oxygène présente un temps de rétention d'environ 0,75 min et l'azote de 1,5 min (Figure 22).

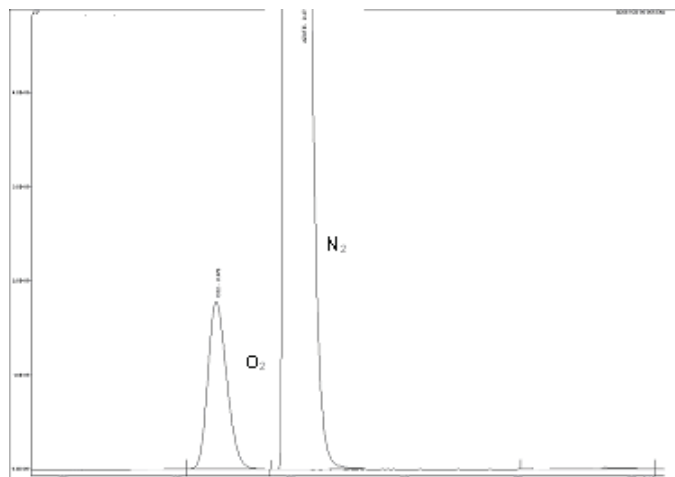


Figure 22 : Réponse catharométrique : azote et oxygène

3.1.5.3 Étalonnage.

Le prélèvement et l'injection du gaz étalon et/ou des phases gazeuses à analyser s'effectuent avec une seringue à gaz Hamilton de 250 μL de capacité. La seringue étanche au gaz est munie d'un système de vanne ouverture/fermeture. Le volume de gaz injecté est de 250 μL .

La calibration pour le CO_2 est faite avec un gaz étalon certifié, du CO_2 dans de l'azote (fournisseur Air Liquide). La teneur en CO_2 du mélange étalon est de l'ordre de 4,8 % (v/v) dans l'azote, elle est donnée avec la précision d'une décimale. La prise d'échantillon de gaz étalon calibré se fait par l'intermédiaire d'une ampoule à gaz. L'ampoule à gaz est balayée à partir de la bouteille étalon munie d'un détendeur. La pression du gaz dans l'ampoule de prélèvement est ramenée à la pression atmosphérique. Cet équilibrage est fait en plongeant l'évent de l'ampoule à gaz dans un récipient contenant de l'eau. Les calibrations à partir des standards sont faites à la pression atmosphérique existante au moment de la calibration. Le prélèvement et l'injection du gaz étalon s'effectuent par une seringue à gaz Hamilton de 250 μL de capacité. La seringue étanche au gaz est munie d'un système de vanne ouverture/fermeture.

Pour obtenir le zéro de la droite d'étalonnage on injecte 250 μL d'air, ce qui correspond à 0,01 μl de CO_2 pur (négligeable). La réponse catharométrique en fonction de la quantité de CO_2 injecté est linéaire jusqu'à 250 μL de gaz étalon injecté avec une teneur autour de 4,8 % CO_2 (v/v) dans l'azote, soit 12,5 μl de CO_2 pur. (cf. Figure 23). La droite de régression présente une valeur de R^2 de 0,99 minimum.

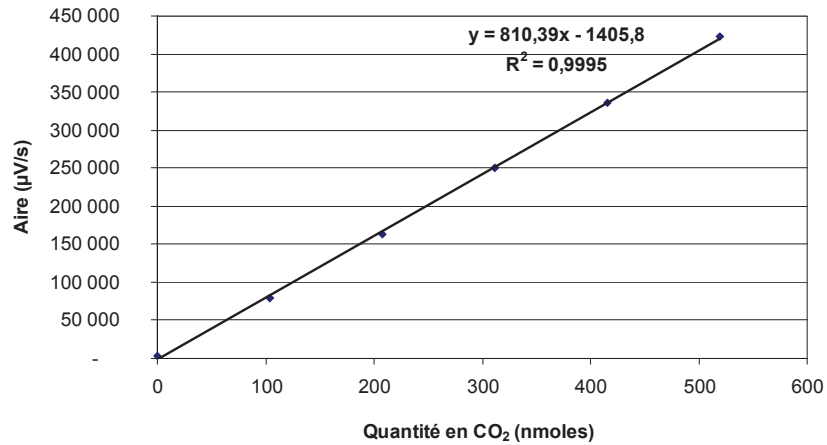


Figure 23 : Gamme étalon CO₂ (4,8 % v/v). Volumes injectés (50, 100, 150, 200 et 250 µL).

La calibration de la réponse catharométrique pour l'O₂ est faite avec de l'air (250 µL injectés). La teneur en oxygène dans l'atmosphère est prise à 20,9 % (v/v). Pour obtenir le zéro de la droite d'étalonnage, on utilise le gaz étalon CO₂ dans de l'azote (fournisseur Air Liquide) utilisé pour la calibration du CO₂. La linéarité de la réponse catharométrique en fonction de la quantité d'O₂ injecté est obtenue jusqu'à 250 µL d'air injecté, soit 52,25 µl d'O₂ pur (cf. Figure 24). La droite de régression présente une valeur de R² de 0,99 minimum.

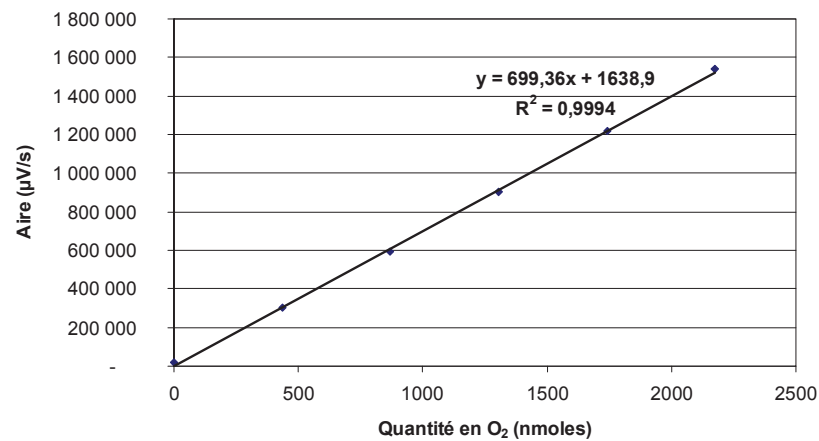


Figure 24 : Gamme étalon oxygène. Volumes d'air injectés (50, 100, 150, 200 et 250 µL).

3.1.6 Analyse élémentaire (CONHS) de la biomasse.

3.1.6.1 Préparation de la biomasse

Les souches sont cultivées dans le milieu minéral recommandé (milieu GN modifié pour les cyanobactéries d'eau douce, milieu ASNIII pour les cyanobactéries marine). Toutefois le CaCl_2 est écarté de ces milieux pour éviter une production de carbonate de calcium lors de la croissance du microorganisme. Les milieux en fin de culture sont acidifiés (HCl) progressivement jusqu'à pH 7 pour éliminer tout précipité éventuel de CaCO_3 . Les cultures sont centrifugées à 10 000 tours/min pendant 60 minutes. Les culots sont ensuite lavés trois fois dans de l'eau physiologique et centrifugés à 10 000 tours/m pendant 50 minutes pour éliminer les sels du milieu de culture. Les culots sont récupérés avec de l'eau distillée et mis à sécher à l'étuve pendant 24 heures à 100°C .

3.1.6.2 Principe de la méthode

On détermine la teneur en CONHS des culots secs de cyanobactérie selon la méthode ASTM 5991 (analyse extérieure, laboratoire SGS MULTILAB, Evry, France).

Analyse de C, N, H :

1 à 3 mg de matériau sec sont introduits dans une nacelle en argent. L'étape d'oxydation s'opère à 1050°C sous hélium avec un apport d'oxygène. Les composés organiques craquent en produisant du CO_2 , du NO_x et de l' H_2O . Le "gaz d'oxydation" est passé sur un tamis avec du cuivre à la même température, permettant une réduction du NO_x en N_2 . Les différents composés issus de l'étape d'oxydation et de la réduction sur le cuivre sont ensuite séparés en CPG et dosés en catharométrie (CO_2 , N_2 et H_2O) permettant d'obtenir les teneurs respectives en carbone, azote et hydrogène de l'échantillon.

Analyse de l'oxygène :

1 à 3 mg de matériau sec sont introduits dans une nacelle en argent. L'étape de combustion sans oxygène s'opère à 1150°C sous azote. Les composés organiques craquent en produisant du CO qui est analysé par une détection infrarouge.

Analyse du soufre :

1 à 3 mg de matériau sec sont introduits dans une nacelle en argent. L'étape de combustion s'opère à 1150°C sous hélium. Les composés organiques craquent en produisant du SO_2 qui est analysé par une détection infrarouge.

3.1.7 Dosage du carbone minéral (carbonate de calcium) et organique (C_{biomasse}) par la technique d'analyse Rock-Eval

Les cultures de cyanobactérie peuvent être mise en œuvre, avec ou sans processus associé de calcification (précipité de carbonate de calcium). A l'arrêt des cultures, la matière insoluble (biomasse seule ou biomasse + CaCO_3) est séparée du milieu de culture par filtration. La biomasse (carbone organique) et le carbonate de calcium (carbone minéral) présent dans la matière insoluble sont dosés par la technique d'analyse Rock Eval (RE). Le Carbone Organique Total (COT) et le Carbone Minéral (MinC) sont exprimés en % de la masse d'échantillon introduite.

3.1.7.1 Principe

Le Rock-Eval est un appareillage mis au point pour la mesure de la matière organique en géochimie et qui s'adresse principalement à des échantillons de roche provenant de forage. L'analyse Rock-Eval (RE) permet notamment de préciser le potentiel en huile des roches et en particulier le potentiel kérogène. Le Rock-Eval permet de doser le Carbone Organique Total (COT) et le Carbone Minéral (MinC) de l'échantillon. L'analyse de la matière organique se fait par le biais de deux cycles d'analyse, le premier, le cycle de pyrolyse, en absence d'oxygène (sous azote), et le second, le cycle d'oxydation, en présence d'oxygène. L'échantillon passe dans le four de pyrolyse, et le résiduel de l'échantillon (résiduel de pyrolyse) passe ensuite dans le second four d'oxydation. Au niveau de l'étape de pyrolyse les produits de thermodistillation et de craquage sont analysés par un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID) pour donner une réponse "HC", et par un détecteur infrarouge pour la mesure du CO et du CO_2 . Au niveau de l'étape d'oxydation les produits de craquage sont analysés par un détecteur infrarouge pour la mesure du CO et du CO_2 .

3.1.7.2 Calibration du RE avec le standard 160000 (roche Kérogène)

La calibration des détecteurs FID et infrarouge du Rock-Eval est réalisée avec un standard de roche mère "160000". Ce standard est une roche Kérogène. Le standard "160000" est systématiquement passé dans chaque séquence d'analyse, au début et en fin de séquence. Le carbone de l'échantillon est exprimé en % p/p de l'échantillon brut.

Les signaux pris en compte dans la quantification du carbone organique (COT) du S160000

S1	mg HC/g échantillon
S2	mg HC/g échantillon
S3CO	mg CO/g échantillon
S3'CO	mg CO/g échantillon,
S3CO ₂	mg CO ₂ /g échantillon
S4CO	mg CO/g échantillon
S4CO ₂	mg CO ₂ /g échantillon

Signaux S1 et S2 : on utilise la valeur moyenne de 83% (% p/p) comme teneur en carbone pour les fractions "HC " qui thermodistillent en pyrolyse et qui sont détectées par FID, sur la base de mesures élémentaires de C et d'H dans ce standard S160000 (83% p/p de C dans l'HC). Cette valeur de 0,83 est une valeur moyenne basée sur des mesures issues de différentes roches (données géochimiques), représentative de la composition du kérogène (Behar et al, 2001).

Signal S3'CO : dans le cas de la présence simultanée de matière organique et de carbonate dans l'échantillon analysé au RE, la réponse du signal S3'CO doit être partagée à 50/50 entre une partie minérale et une partie organique pour la raison suivante : au cours du cycle de pyrolyse la décomposition thermique de la matière organique produit du CO et du CO₂, et la matière minérale produit uniquement du CO₂. Une partie du pool de CO₂ provenant à la fois de la matière minérale et de la matière organique réagit en présence de biomasse, (par des réactions de Woodward), pour donner du CO dans S3'CO.

- moitié de S3'CO pris en compte si il y a présence d'une réponse S5,
- totalité de S3'CO pris en compte si pas de réponse S5,

Les signaux pris en compte dans l'évaluation du carbone minéral (MinC) du S 160000

S3'CO mg CO/g échantillon,

- moitié de S3'CO pris en compte si présence d'un carbone organique
- totalité de S3'CO si pas de carbone organique

S3'CO₂ mg CO₂/g échantillon

S5CO₂ mg CO₂/g échantillon

Les réponses des signaux sont reprises dans les équations suivantes :
pour la réponse du C organique :

$$TOC = PC + RC$$

PC (Carbone de pyrolyse):

$$PC = (S1 + S2) \times 0,083 + (S3CO_2 \times \frac{12}{440}) + (S3CO + \frac{1}{2} S3'CO) \times \frac{12}{280}$$

RC (Carbone organique résiduel):

$$RC = (S4CO_2 \times \frac{12}{440}) + (S4CO \times \frac{12}{280})$$

pour la réponse du C minéral :

$$MinC = PyroMinC + OxiMinC$$

PyroMinC (Carbone minéral de pyrolyse):

$$PyroMinC = (S3'CO_2 \times \frac{12}{440}) + (\frac{1}{2} S3'CO \times \frac{12}{280})$$

OxiMinC (Carbone minéral):

$$OxiMinC = S5CO_2 \times \frac{12}{440}$$

Commentaire sur la constante 0,083 dans l'équation PC ci dessus :

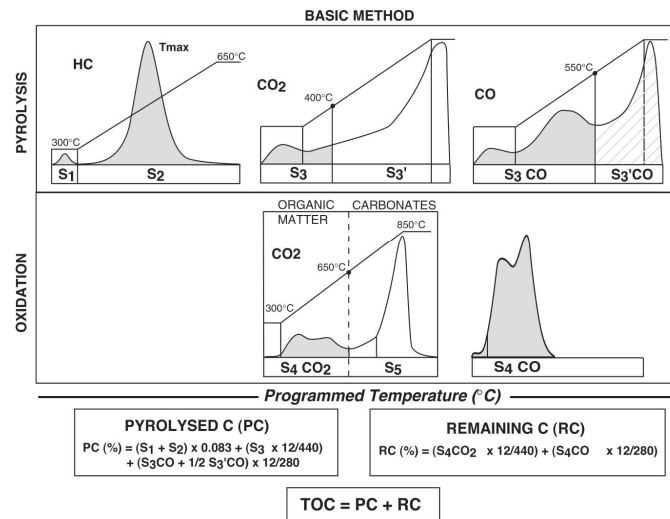
Cette valeur de 0,083 est issue de la constante 0,83 qui représente la teneur en carbone des HC issus de la thermodistillation et du craquage du kérogène dans le standard S160000 (Ces HC répondent dans les signaux S1 et S2 de FID). La modification de 0,83 à 0,083 exprime le changement d'unité dans l'expression des résultats, pour passer d'HC (en mg HC/g échantillon) à C (% p/p échantillon). Le rapport C/(C+H) des produits de thermo distillation de la biomasse de cyanobactérie est vraisemblablement un peu différent de celui du carbone organique du kérogène pris à 0,83 pour les signaux S1 et S2.

Commentaires sur les facteurs 12 et 280, et 440 :

Ces valeurs traduisent, de la même façon, le changement d'unité dans l'expression des résultats pour passer de CO et de CO₂ (en mg/g échantillon) à C (% p/p échantillon).

La Figure 25 présente un exemple des différents signaux d'un échantillon S160000 (Behar et al., 2001).

TOC DETERMINATION



MINERAL C DETERMINATION

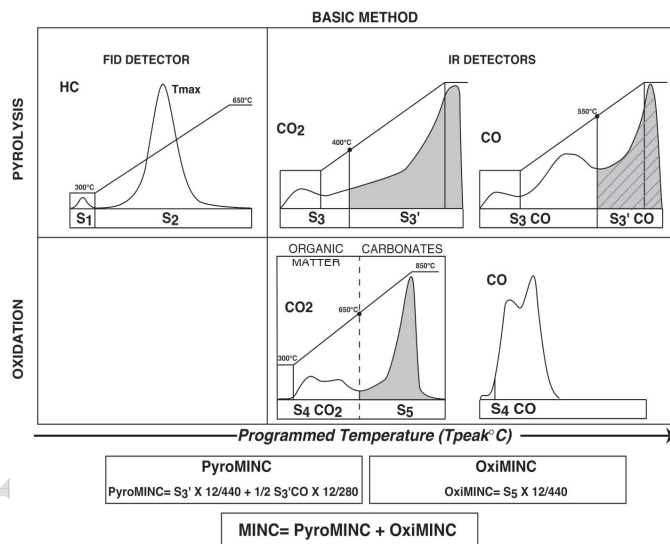


Figure 25 : Réponses en oxydation et en pyrolyse d'une roche mère avec "kérogène" : Detection d'une fraction C minéral et C organique (Behar et al., 2001).

3.1.7.3 Adaptation des cycles de pyrolyse et d'oxydation pour le dosage du COT et du MinC pour l'analyse de biomasse en présence ou non de carbonate de calcium

De la biomasse pure et du CaCO₃ pur ont été passés à l'analyse Rock-Eval. Le carbone organique issu de la biomasse réponds dans les signaux S1, S2, S3CO, S3'CO, S3CO₂, S4CO et S4CO₂; le carbone minéral issu du carbonate de calcium réponds dans les signaux S3'CO, S3'CO₂ et S5CO₂.

Une adaptation des méthodes standardisées d'analyse pour les roches mères a été faite pour répondre aux problèmes spécifiques du dosage de la matière organique issue d'une biomasse du type cyanobactérie, associée ou non à du carbonate de calcium. Ces

modifications portent essentiellement sur les programmes (ou cycles) d'analyse et les profils d'intégration permettant l'identification et la quantification de la biomasse et du carbonate de calcium sans interférence si ils sont présents ensembles dans la matière insoluble analysée.

Les cycles de pyrolyse et d'oxydation utilisés sont les suivants :

Cycle de pyrolyse : sous flux d'azote

Pyrolyse			
	Température	pente	durée
isotherme	300°C		3 min
gradient	300-650°C	25°C/min	14 min
isotherme	650°C		5 min
fin	650°C-	↔ sans chauffage	5 min

Les signaux identifiés en pyrolyse sont les suivantes :

Pyrolyse				
S1	détection FID	isotherme	300°C	exprimé en mg HC/g d'échantillon
S2	détection FID	gradient	300-650°C	exprimé en mg HC/g d'échantillon
S3CO	détection infrarouge	gradient	300-550°C	exprimé en mg CO/g d'échantillon
S3'CO	détection infrarouge	gradient	550-650°C	exprimé en mg CO/g d'échantillon
S3CO ₂	détection infrarouge	gradient	300-650°C	exprimé en mg CO ₂ /g d'échantillon
S3'CO ₂	détection infrarouge	isotherme	650°C	exprimé en mg CO ₂ /g d'échantillon

Cycle d'Oxydation : sous flux d'air synthétique (N₂ 80%; O₂ 20%)

Oxydation			
	Température	pente	durée
isotherme	300°C		1 min
gradient	300-850°C	20°/min	27,5 min
isotherme	850°C		10 min
fin	850°C-	↔ sans chauffage	10 min

Les signaux identifiés en oxydation sont les suivants :

Oxydation			
S4CO	détection infrarouge	300-850°C	exprimé en mg C O/g d'échantillon
S4CO ₂	détection infrarouge	300-650°C	exprimé en mg CO ₂ /g d'échantillon
S5CO ₂	détection infrarouge	650-850°C	exprimé en mg CO ₂ /g d'échantillon

Pour déterminer les meilleurs profils d'intégration des signaux dans le cas d'un mélange de biomasse et de carbonate de calcium, des comparaisons des profils obtenus pour de la biomasse, du carbonate de calcium et des mélanges biomasse + carbonate de calcium ont été mis en œuvre. Les problèmes de séparation des signaux pour la biomasse et le carbonate de calcium concernent seulement les signaux indiquées ci dessous, pour lesquelles un réajustement manuel du curseur est nécessaire :

Cycle de pyrolyse : signaux S3CO₂ et S3'CO₂;

Cycle d'oxydation : signaux S4CO₂ et S5CO₂.

Les curseurs ont été positionnés à 18,33 min pour S3CO₂ et S3'CO₂ et à 19,67 min pour S4CO₂ et S5CO₂. La Figure 26 et la Figure 27 représentent les comparaisons entre ces 4 signaux (S3CO₂ et S3'CO₂; S4CO₂ et S5CO₂) pour les 3 types d'essais : biomasse (2 quantités), carbonate de calcium (3 quantités) et mélange biomasse et carbonate de calcium (3 mélanges).

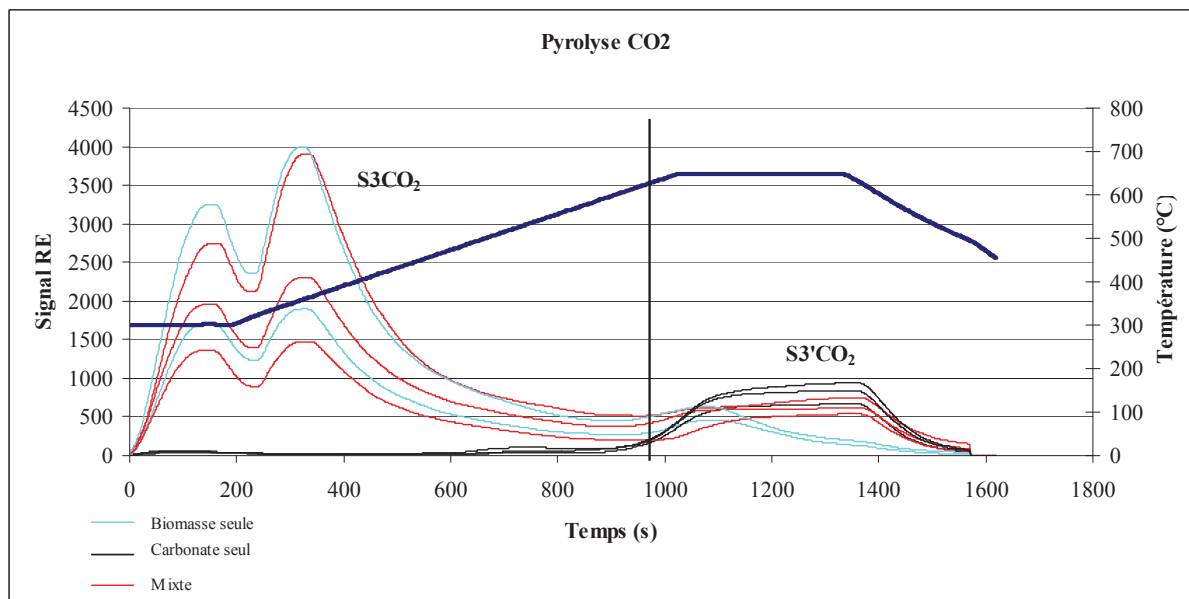


Figure 26 : Positionnement des curseurs pour les signaux S3CO₂ et S3'CO₂ (Cycle de pyrolyse)

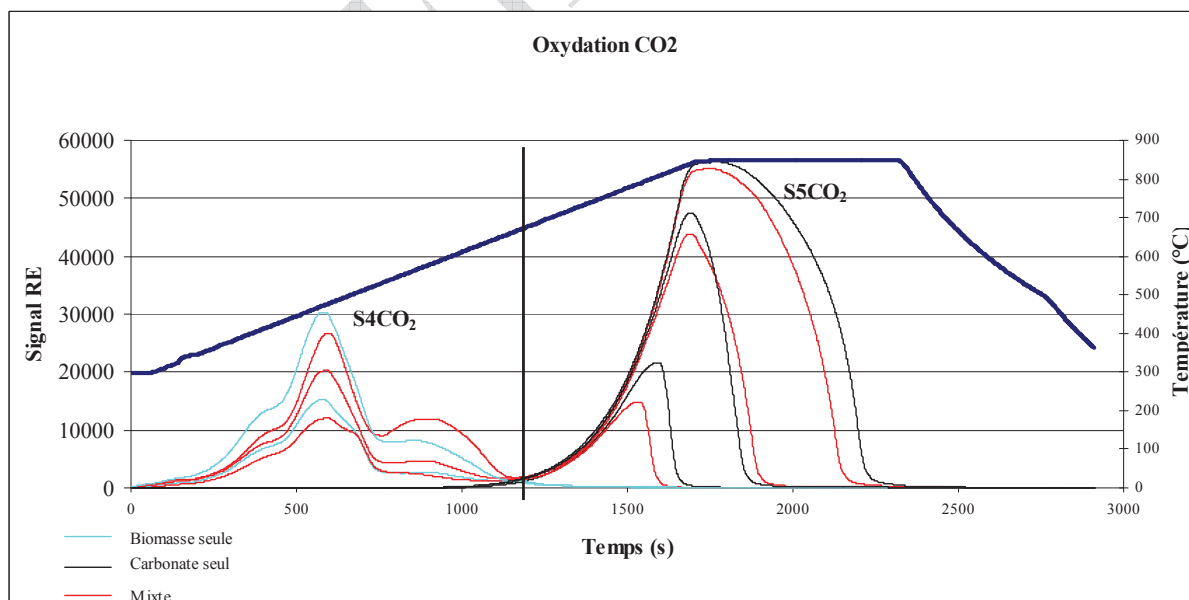


Figure 27 : Déterminations des curseurs pour les signaux S4CO₂ et S5CO₂. (Cycle d'oxydation)

3.1.7.4 Réponses de la biomasse et du CaCO₃ à l'analyse RE

➤ *Réponse de la biomasse au RE*

Une biomasse (souche PCC8806, souche marine) a été cultivée dans des conditions où la formation de carbonate de calcium est nulle. La biomasse séchée est déposée dans la nacelle d'analyse sur un lit de silice, puis recouverte à nouveau par de la silice. Il est impératif de séparer la matière insoluble (biomasse seule ou biomasse + CaCO₃) filtrée du filtre (la membrane de filtration répond au RE et interfère dans l'analyse).

La Figure 28 montre la réponse de la biomasse. La quantité de biomasse mise en œuvre est de 16,2 mg. On obtient une réponse TOC de 40,62 (% poids de l'échantillon sec) et une réponse MinC nulle (% poids de l'échantillon). Le carbone présent dans la biomasse donne une réponse essentiellement dans les fractions S1+S2 de pyrolyse (44% p/p) et S4CO₂ d'oxydation (46% p/p). On ne détecte pas de réponse de C minéral (S3'CO, S3'CO₂ et S5CO₂).

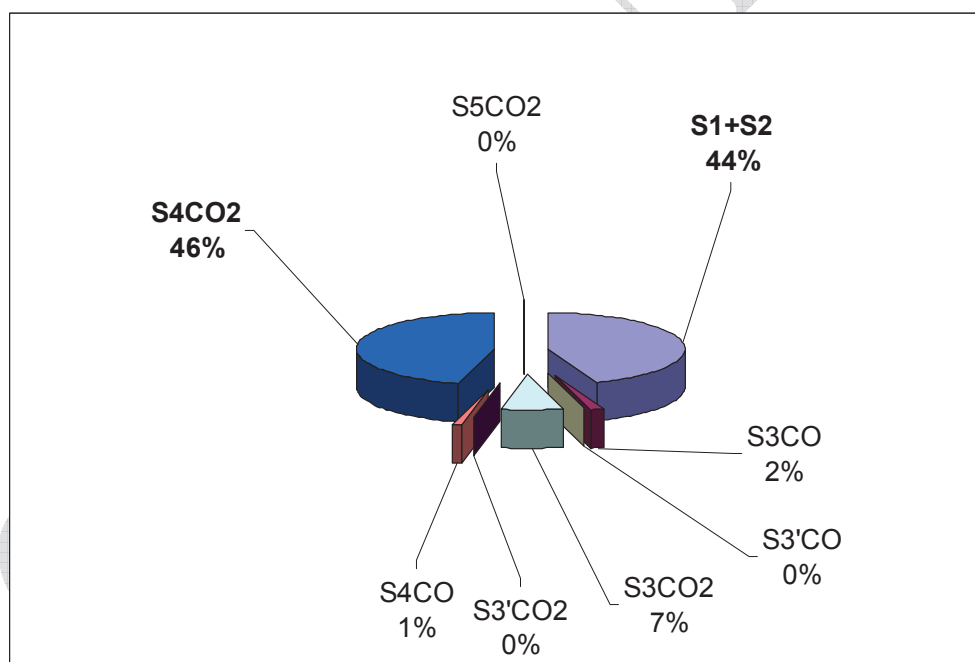


Figure 28 : Distribution du carbone organique (TOC) de la biomasse (souche PCC 8806)

➤ *Réponse du carbonate de calcium au RE*

Le carbonate de calcium utilisé a une pureté de 98 % (VWR). Le carbonate de calcium est déposé dans la nacelle d'analyse sur un lit de silice, puis recouvert à nouveau par de la silice. La Figure 29 présente la réponse du carbonate de calcium. La quantité d'échantillon mise en œuvre est de 30,45 mg. On obtient une réponse TOC de 0,09 (% poids de l'échantillon) et une réponse MinC de 12,85 (% poids de l'échantillon). On peut considérer

que la réponse organique est nulle. Théoriquement la teneur en C_{\min} devrait être de 12%.(p/p). Le carbone présent dans le $CaCO_3$ donne une réponse principalement dans la fraction $S5CO_2$ d'oxydation (97%) et $S3'CO_2$ de pyrolyse (3%).

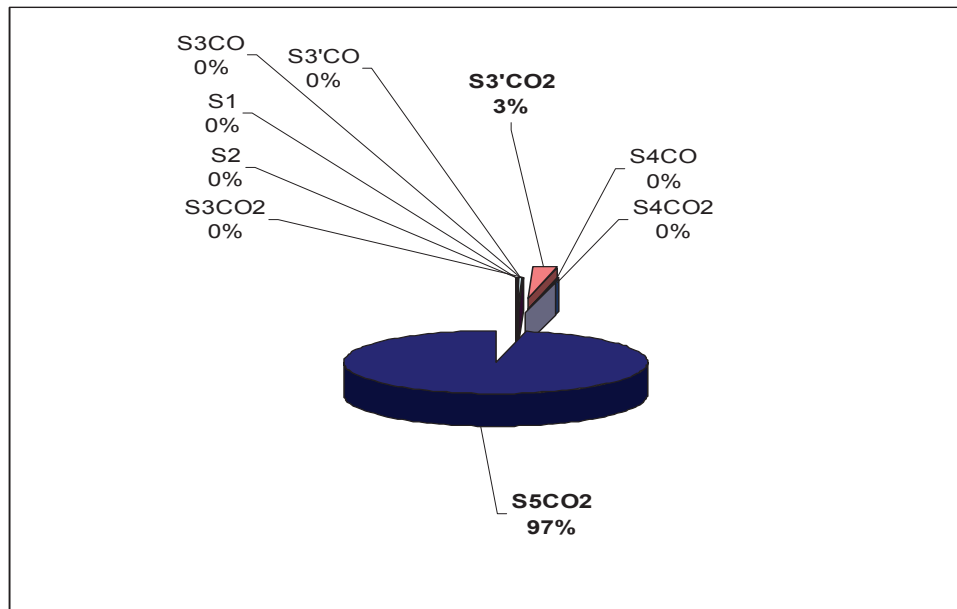


Figure 29 : Distribution du carbone minéral pour un échantillon de $CaCO_3$ pur.

3.1.7.5 Étalonnage et quantification de la biomasse et du carbonate de calcium

➤ *Étalonnage de la réponse de la biomasse*

On a analysé des quantités variables de biomasse (souche PCC 8806 cultivée sans charge minérale ($CaCO_3$)). La réponse de la biomasse est calculée en prenant en compte les fractions suivantes : S1, S2, S3CO, S3'CO, S3CO₂, S4CO, et S4CO₂. Les valeurs des 2 fractions S1 et de S2 sont exprimées (par le logiciel du RE) en mg HC/g d'échantillon introduit dans la nacelle. Ces valeurs sont transformées en μmol de carbone pour la quantité d'échantillon analysé (en mg). Le calcul fait appel à la teneur en carbone (83%) du standard S160000. De même, les valeurs des 5 fractions S3CO, S3'CO, S3CO₂, S4CO, et S4CO₂, qui sont exprimées en mg CO ou CO₂/g d'échantillon introduit dans la nacelle (par le logiciel du RE), sont transformées en μmol de carbone pour la quantité d'échantillon analysé (en mg). On additionne la quantité de carbone obtenue dans ces 7 fractions (en μmol de carbone). On trace une relation mg de biomasse sèche déposée dans la nacelle (abscisse)/ μmol de C (en ordonnée).

La Figure 30 et le Tableau 6 présentent les réponses au RE de la biomasse pour la souche PCC 8806.

Tableau 6 : Gamme étalon biomasse (souche PCC8806).

	Biomasse introduit mg	Carbone organique RE μmole	Teneur en Carbone de la biomasse % (p/p)
1	4.1	149	44
2	8.2	287	42
3	12.1	417	41
4	16.2	558	41

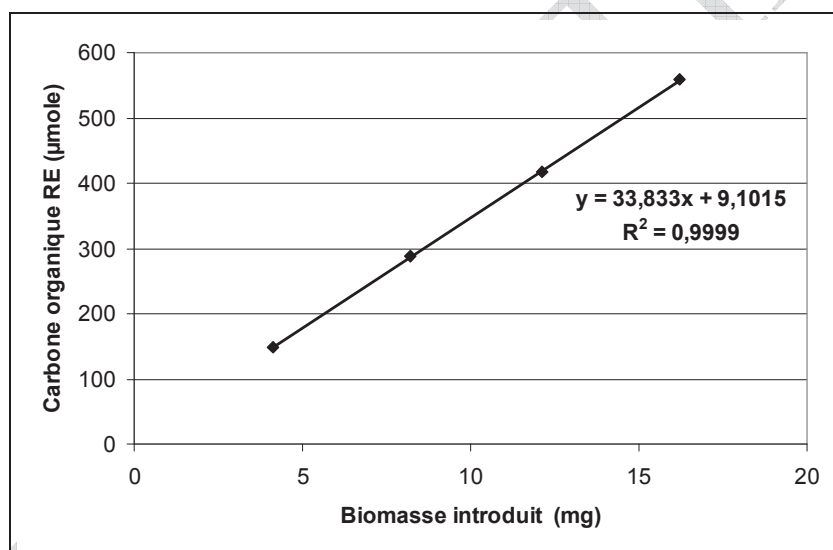


Figure 30: Gamme étalon biomasse (souche PCC8806).

➤ **Étalonnage de la réponse du carbonate de calcium**

On a analysé des quantités variables de carbonate de calcium (pureté 98%). La quantité de carbonate de calcium (CaCO_3) est calculée en prenant en compte les fractions suivantes : S^3CO_2 et S^5CO_2 . Les valeurs de ces deux fractions, qui sont données en $\text{mg CO}_2/\text{g}$ d'échantillon introduit dans la nacelle, sont ré-exprimées en μmol de carbone pour la quantité d'échantillon analysée (en mg). On additionne la quantité de carbone (en μmol) obtenues dans ces 2 fractions. On trace une relation mg de carbonate de calcium déposé dans la nacelle (abscisse)/somme μmol de C (en ordonnée).

La Figure 31 et le Tableau 7 présentent les réponses au RE du carbonate de calcium.

Tableau 7 : Gamme étalon carbonate de calcium.

	CaCO ₃ introduit mg	Carbone minéral RE μmole
1	5,2	52
2	11,1	113
3	20,7	217
4	49,5	534
5	70,9	768

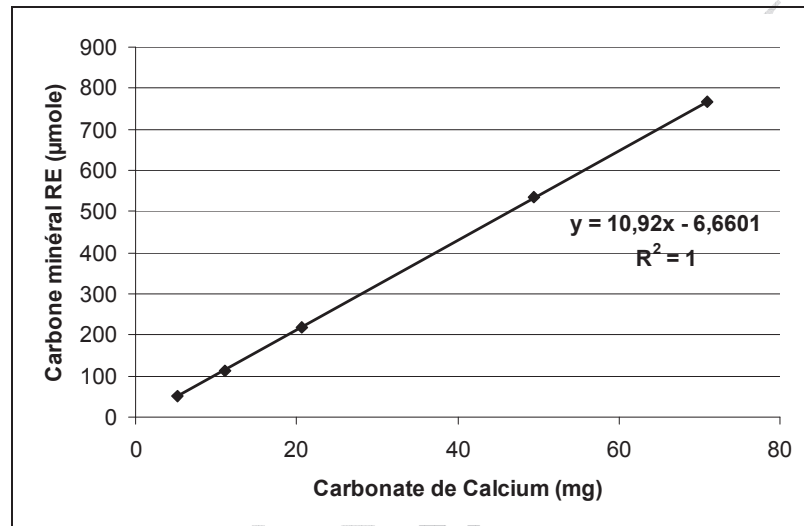


Figure 31 : Gamme étalon carbonate de calcium.

➤ **Quantification de mélanges biomasse plus carbonate de calcium**

La quantification de biomasse et de carbonate de calcium a été évaluée sur différents mélanges composés de biomasse pure et de carbonate de calcium pur. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Quantification du carbone organique et minéral pour les mélanges de biomasse et de carbonate.

	CaCO ₃ introduit mg	Biomasse introduit mg	Carbone minéral RE μmole	Carbone organique RE μmole	CaCO ₃ dosé mg	Biomasse dosé mg
1	7,0	7,0	72	239	7,2	6,8
2	30,2	10,2	329	347	30,8	10,0
3	59,7	15,2	651	515	60,2	15,0

3.1.7.6 Bilan "Masse RE"

Le bilan "Masse" RE consiste à comparer le poids sec d'échantillon introduit dans la nacelle (biomasse seule ou biomasse + CaCO_3 ou CaCO_3 seul), avec les poids de biomasse et de carbonate recalculés à partir des données de l'analyse RE. Le résiduel présent dans la nacelle à l'issue de l'analyse RE est pris en compte. L'analyse RE est en effet destructive, la biomasse est détruite sous forme de CO , de CO_2 et d'HC. Le carbonate de calcium est détruit sous la forme de CO_2 . On fait l'hypothèse par ailleurs que la décomposition du carbonate de calcium entraîne dans le résidu, à l'issue des cycles de pyrolyse + oxydation, la formation de CaO (dans la nacelle). Le résidu dans la nacelle est théoriquement composé de :

- sels (produits mal identifiés) provenant du milieu de culture
- calcium issu de la décomposition thermique du carbonate de calcium, sous forme de CaO .

On soustrait l'oxygène provenant de la décomposition du CaCO_3 présent sous forme de CaO dans le résidu. Pour cela, le nombre de mole de Ca et donc de CaO est calculé sur la base du nombre de moles de calcium qui est égal au nombre de mole de carbone minéral mesuré dans la fraction minérale.

Le Tableau 9 présente des bilans "Masse" RE sur des échantillons composés à partir de biomasse, de carbonate de calcium et de mélanges de biomasse + de carbonate de calcium. Pour la biomasse, le bilan "Masse RE" s'établit entre 102 et 111%. Pour le carbonate de calcium, le bilan "Masse RE" (en prenant en compte le CaO dans la nacelle) s'établit entre 122 et 125%. Avec un mélange de biomasse et de carbonate de calcium, nous avons un bilan masse intermédiaire compris entre 114 et 119%, ce qui est donc normal, compte tenu des valeurs de "bilan Masse" RE obtenues pour la biomasse seule et le carbonate seul.

Tableau 9: Bilan Masse pour les échantillons de biomasse pure et de carbonate pur et pour des mélanges biomasse + carbonate de calcium.

	Quantité introduite CaCO3	Quantité introduite Biomasse	Quantité dans nacelle Total	CaCO3 analyse RE	Biomasse analyse RE (1)	CO3 (2)	résidu + Ca (3)	Bilan Masse (4)
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	%
CaCO3_1	4.98		4.98	4.94	0.04	3.0	3.23	125
CaCO3_2	10.82		10.82	10.78	0.06	6.5	6.83	123
CaCO3_3	20.13		20.13	19.61	0.09	11.8	12.67	122
CaCO3_4	30.45		30.45	30.24	0.08	18.1	19.19	123
CaCO3_5	50.59		50.59	50.63	0.04	30.4	31.53	122
CaCO3_6	70.04		70.04	70.30	0.06	42.2	43.27	122
CaCO3_7	90.61		90.61	90.58	0.06	54.3	56.09	122
Bio_1(8806)		4.12	4.12	0.00	4.31	0.0	0.27	111
Bio_2(8806)		8.21	8.21	0.00	8.31	0.0	0.56	108
Bio_3(8806)		12.12	12.12	0.00	12.07	0.0	0.28	102
Bio_4(8806)		16.20	16.20	0.00	16.15	0.0	1.15	107
Mix_1	6.98	6.98	13.96	6.70	6.90	4.0	4.94	114
Mix_2	30.18	10.20	40.38	30.60	10.04	18.4	19.50	119
Mix_3	59.67	15.17	74.84	60.46	14.90	36.3	37.75	119

(1) analyse RE, calibration avec biomasse

(2) Le carbonate de calcium se décompose en CO₂ et CO au cours de l'analyse RE. La valeur de Cmin obtenue est transformée en CO3.

(3) Le carbonate de calcium décomposé forme du CaO qui s'ajoute aux autres résidus salins. On élimine de ce résidu sec après l'analyse RE, l'oxygène combinée au calcium, sur la base d'un nombre de mole de calcium égal au nombre de mole de Cminéral obtenu.

(4) = (biomasse + CO3 + sels+Ca)*100/quantité introduite.

CONFIDENTIEL

3.2 Microbiologie

3.2.1 Souches utilisées

Quatre souches de cyanobactéries provenant de la collection de Pasteur (PCC) ont été utilisées pendant cette étude :

- trois souches issues d'environnement marin : deux souches de *Synechococcus* (PCC8806, PCC8807) et une souche de *Synechocystis* (PCC 7339);
- une souche d'origine d'eau douce : *Synechocystis* (PCC6808).

3.2.2 Milieux de culture

3.2.2.1 Milieux de propagation

Deux milieux différents de culture sont utilisés selon l'origine de la souche : un milieu eau douce et un milieu marin. Ces milieux de culture sont recommandés par l'Institut Pasteur (voir information sur le site : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000m-00a/recherche/departements-scientifiques/microbiologie/unites-et-groupes/collection-des-cyanobacteries>).

Les compositions des milieux sont données dans le Tableau 10. Le pH du milieu minéral de culture est ajusté à 8,0 au départ de l'essai.

Tableau 10:Composition des milieux eau douce et marin

Milieux	Eau douce GN (BG11)	Marin ASN III
NaCl	mM	427
MgCl ₂ -6H ₂ O	mM	9,8
KCl	mM	6,7
NaNO ₃	mM	17,65
MgSO ₄ -7H ₂ O	mM	0,3
CaCl ₂ -2H ₂ O	mM	0,25
Na ₂ CO ₃	mM	0,38
K ₂ HPO ₄	mM	0,18
acide citrique	mM	0,03
Citrate de fer et d'ammonium	mM	0,03
Dipotassium Mg EDTA	mM	0,003
Trace Metal Mix A5+Co*	mL	1
Vit B12	µg/L	20
Tampon HEPES-NaOH	mM	5

*Trace metal mix A5+Co (g/L): H₃BO₃ 2.86(g/L), MnCl₂-4H₂O 1.81(g/L), ZnSO₄-7H₂O 0.222(g/L), Na₂MoO₄-2H₂O 0.39(g/L), CuSO₄-5H₂O 0.079(g/L), Co(NO₃)₂-6H₂O 0.049(g/L)

Pour certains essais, ces milieux de culture ont été simplifiés. L'acide citrique, le citrate double de fer et d'ammonium, ainsi que l'EDTA/2K Mg ont été supprimés. Les versions modifiées de ces milieux eau douce et marin sont présentées dans le Tableau 11. Le pH du milieu minéral de culture est toujours ajusté à pH 8,0.

Tableau 11 : Composition des milieux eau douce et marin (version simplifiée)

Milieux		Eau douce GN (BG11)	Marine ASN III
NaCl	mM		427
MgCl ₂ -6H ₂ O	mM		9,8
KCl	mM		6,7
NaNO ₃	mM	17,65	8,8
MgSO ₄ -7H ₂ O	mM	0,3	14,2
CaCl ₂ -2H ₂ O	mM	0,25	3,4
Na ₂ CO ₃	mM	0,38	0,38
K ₂ HPO ₄	mM	0,18	0,09
FeCl ₃ -6H ₂ O	mM	0,03	0,015
Trace Metal Mix A5+Co*	mL	1	1
Vit B12	µg/L	20	20
Tampon HEPES-NaOH	mM	5	5

*Trace metal mix A5+Co (g/L): H₃BO₃ 2.86(g/L), MnCl₂-4H₂O 1.81(g/L), ZnSO₄-7H₂O 0.222(g/L), Na₂MoO₄-2H₂O 0.39(g/L), CuSO₄-5H₂O 0.079(g/L), Co(NO₃)₂-6H₂O 0.049(g/L)

3.2.2.2 Milieux pour la croissance

Un milieu de culture a été mis en œuvre est dénommé milieu 617 modifié (modifié de Lee *et al.*, 2006) pour les souches marines. La composition est présentée dans le Tableau 12. Le CaCl₂ et le NaHCO₃ figurent dans ce tableau comme variables. Ces concentrations relatives à ces deux éléments sont précisées lors de la mise en œuvre des essais.

Tableau 12: Composition du milieu 617 modifié.

Milieu 617 modifié		
NaCl	mM	171,00
NaNO ₃	mM	17,65
MgSO ₄ -7H ₂ O	mM	0,30
CaCl ₂ -2H ₂ O	mM	variable
K ₂ HPO ₄	mM	0,18
FeCl ₃ -6H ₂ O	mM	0,030
NaHCO ₃	mM	variable
Trace Metal Mix A5+Co*	mL	1
Vit B12	µg/L	20

*Trace metal mix A5+Co (g/L): H₃BO₃ 2.86(g/L), MnCl₂-4H₂O 1.81(g/L), ZnSO₄-7H₂O 0.222(g/L), Na₂MoO₄-2H₂O 0.39(g/L), CuSO₄-5H₂O 0.079(g/L), Co(NO₃)₂-6H₂O 0.049(g/L)

3.2.3 Mise en œuvre des cultures

Les cultures en milieu ouvert (sans limitation de la source du carbone) sont bouchées à l'aide d'un bouchon mousse qui permet les échanges gazeux avec l'atmosphère, tout en conservant la stérilité du milieu de culture. Les cultures sont réalisées dans deux types de fioles :

- fiole de pénicilline de 120 ml, avec 20 ml de volume réactionnel,
- flacon SCHOTT en verre borosilicate de 1 L ou 2 L, avec 500 ml ou 1 L de volume réactionnel.

Les cultures en milieu fermé sont bouchées à l'aide des bouchons SCHOTT munis de septum caoutchouc/téflon. Les cultures sont réalisées dans deux types de fioles :

- Pour les essais de croissance sur bicarbonate.

Flacon SCHOTT de 500 ml de capacité, munis de 2 tubulures latérales afin d'effectuer des prélèvements liquide ou gazeux. Le volume réactionnel de culture est de 200 ml,

- Pour les essais de croissance avec apport de carbone minéral sous forme de CO₂.

Flacon SCHOTT de 2 L de capacité, munis de 4 ouvertures sur le bouchon afin d'effectuer des prélèvements liquide ou gazeux, pour le suivi du pH en continu et pour l'injection du CO₂. Le volume réactionnel de culture est de 1500 ml.

Les cultures sont incubées dans une armoire climatique à 25°C (Snijders, ECD01E). L'éclairage est de 1,79 kLux (35,8 µmol.m⁻².s⁻¹) avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Une agitation de type va et vient (60 rpm) est appliquée. Un deuxième type d'agitation par un

barreau magnétique (200 rpm) est appliquée pour certains essais. Le type d'agitation est précisé pour chaque essai.

3.2.4 Suivi de la croissance des cyanobactéries

3.2.4.1 Dénombrement des cellules au microscope et suivi de la croissance par la mesure de l'absorbance

Le nombre de microorganismes est estimé par comptage au microscope optique (grossissement 10×100) sur une cellule de Malassez (volume $1\ \mu\text{l}$). La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (pour la turbidité). Les mesures sont effectuées sur un spectromètre (Shimadzu, UV-1601). Une relation entre la densité optique (DO) à 600 nm et le nombre de cellules a été établie pour trois souches étudiées. Ces relations sont présentées dans les Figure 32, Figure 33 et Figure 34

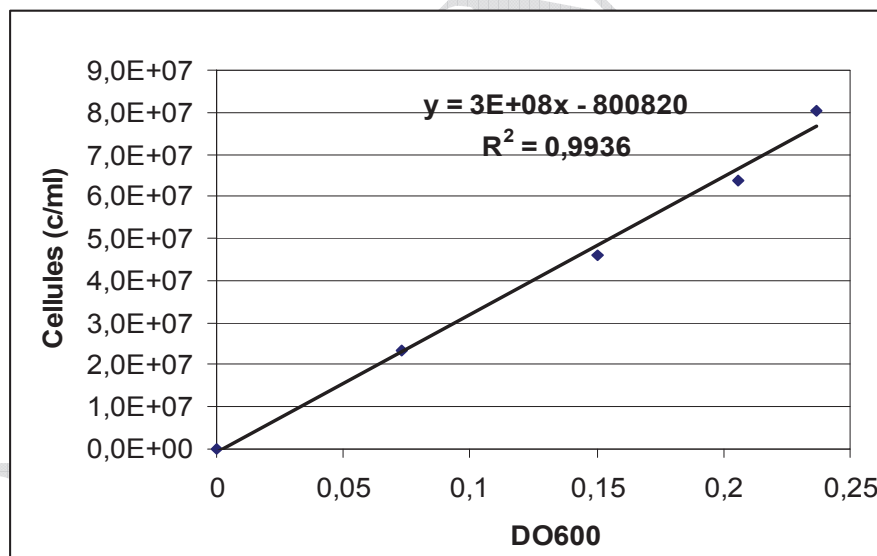


Figure 32 : Relation entre l'absorbance (600 nm) et le nombre de cellules pour la souche PCC6808

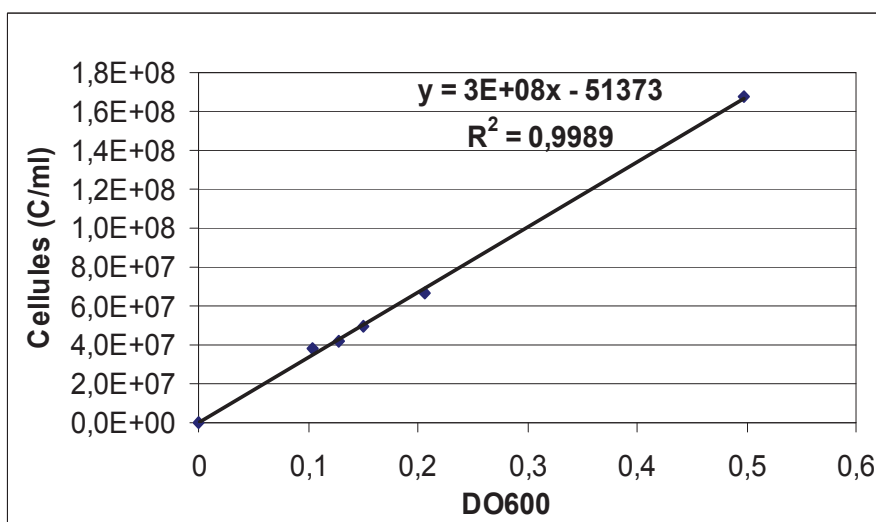


Figure 33 : Relation entre la densité optique (600 nm) et le nombre de cellules pour la souche PCC8806

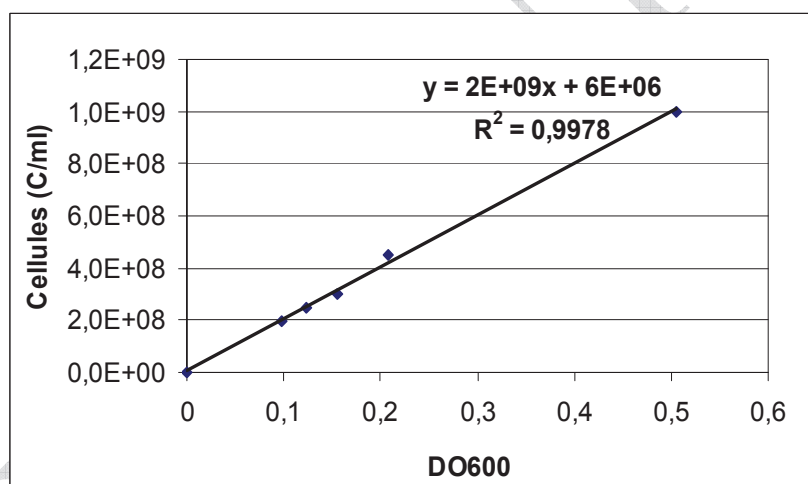


Figure 34 : Relation entre la densité optique (600 nm) et le nombre de cellules pour la souche PCC8807

3.2.4.2 Détermination du poids sec

La "matière insoluble" est filtrée sous vide sur un filtre PTFE 0,45 µm (référence FH, Millipore). La "matière insoluble" est séparée du filtre, l'ensemble est séché dans la même coupelle, à 100 °C pendant 24 heures. Les mesures de poids sont réalisées sur une balance (AE 260 Delta Range ; METTLER TOLEDO) avec une précision de 0,0001g.

NB : Le terme "matière insoluble" sous entend, dans le cas des cultures de cyanobactéries avec précipitation de carbonate de calcium, à la fois la biomasse et le carbonate de calcium récupérés ensemble à l'étape de filtration.

3.2.4.3 Mesure du pH

Pour les prélèvements, le pH est mesuré par un pH-mètre (SevenEasy ; METTLER TOLEDO). Pour certains essais le suivi du pH en continu est également réalisé par un pH-mètre (SevenMulti ; METTLER TOLEDO) qui permet d'enregistrer les données, à l'aide du logiciel LabX direct pH (METHROM). Les mesures sont ensuite traitées sur Excel.

3.3 Observation en microscope électronique à balayage

Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été réalisées au centre de microscopie de l'université de Lyon I et dans le département de géochimie de l'IFP.

3.3.1 Préparation avec fixation des cellules

Le protocole utilisé de "fixation" de la matière insoluble qui représente la biomasse ou/et le carbonate de calcium va essayer de conserver les structures des cellules des cyanobactéries pour que l'on puisse les observer avec le moins de dénaturation possible. La matière insoluble issue de la culture de cyanobactérie (biomasse produite et CaCO_3 précipité) récupérées par filtration sur filtre PTFE est mise en suspension dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) pendant 1 heure. La solution de glutaraldéhyde à 2,5 % est préparée à partir d'une solution de glutaraldéhyde à 25 % (v/v). La dilution au 1/10 est effectuée dans un tampon phosphate pH 7,4. La suspension est ensuite lavée 2 fois avec cette solution de tampon phosphate pH 7,4. Entre chaque lavage, la suspension est centrifugée à 6000 rpm pendant 30 min. Au troisième lavage, la suspension est filtrée sur filtre PTFE (0,45 μm), la matière insoluble est alors séparée du filtre et séchée dans une étuve à 40°C. Après séchage et refroidissement, la fraction insoluble est broyée légèrement et déposée sur une membrane en carbone qui est ensuite métallisée avec une fine couche d'or. La membrane métallisée est montée sur un porte-objet et placée dans la chambre d'observation. Les observations sont faites en mode conventionnel (sous vide).

3.3.2 Préparation sans fixation des cellules

Les échantillons sont prélevés au sein du milieu de culture à différents moments de la croissance. 100 μl de milieu de culture sont déposés sur un filtre polycarbonate (0,2 μm) qui est mis en contact avec un papier filtre saturé en eau MilliQ, l'ensemble est placé dans un

dessiccateur humide (c'est à dire saturé en eau MilliQ) pendant 24 heures. Cette procédure permet d'éliminer le maximum de sels provenant du milieu salin par diffusion dans le papier filtre. Ces sels en effet cristallisent lors du séchage de la préparation et interfèrent dans l'imagerie en microscopie électronique. Le filtre est ensuite récupéré et mis à sécher dans un dessiccateur à température ambiante pendant au moins 48 heures. Après séchage, le filtre est déposé sur un support qui est métallisé avec une couche d'or/platine (épaisseur de 8-15nm pour un temps de métallisation de 2 min avec un plasma à 18 mA). La membrane métallisée est montée sur un porte-objet et placée dans la chambre d'observation. Les observations sont faites en mode conventionnel (sous vide) à faible énergie (5 kV).

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

4 Résultats

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

4.1 Conversion of bicarbonate into biomass and calcium carbonate by the Cyanobacteria strain *Synechococcus* sp. PCC 8806

Lun Li^{1,2}, Frank Haeseler¹, Philippe Oger^{3,4,5}, Gilles Dromart^{3,4,5} and Denis Blanchet^{1*}

¹Institut Français du Pétrole Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois Préau, 92852 Rueil Malmaison, France; ²Ecole Doctorale Matériaux de Lyon, France ³Université de Lyon, France; ⁴CNRS, UMR5570, Laboratoire de Sciences de la Terre, 15 parvis René Descartes BP 7000, Lyon, F-69 342, France; ⁵ENS de Lyon, France;

Corresponding author, E-mail: denis.blanchet@ifpenergiesnouvelles.fr; Fax: +33 1 47 52 70 58; Tel: +33 1 47 52 66 89

Abstract

Utilization of bicarbonate in cyanobacterial photosynthesis releases hydroxyl ions which react with bicarbonate to produce carbonate. In sea water this increase in carbonate concentration can lead to calcite precipitation in the presence of calcium. In natural environments, this could take place in conditions such as high density cell blooms or mats. Cyanobacteria considered as calcifiers obviously rely on this physiological mechanism to perform calcification and photosynthesis in a putative 1:1 molar ratio. Our study was designed to thoroughly investigate this photosynthesis/precipitation ratio. We used the Rock Eval[®] technology to determine the quantity of both carbon and calcium incorporated into the biomass and calcium carbonate. *Synechococcus* PCC 8806 was grown in mineral culture medium enriched with various bicarbonate and calcium concentrations in a closed reactor preventing atmospheric CO₂ exchange. Our findings show that cyanobacterial growth on bicarbonate results in a rise of carbonate ions and large pH change. During cells growth, C_{HCO₃⁻} was distributed to C_{biomass} and C_{CO₃⁻} with a ratio of ≈ 0.5 . The biomass produced was independent of the calcium concentration in the growth medium. The calcium carbonate precipitation depends mainly on both calcium and bicarbonate concentrations.

Introduction

Throughout Earth's history, particularly during the Precambrian period, microorganisms (including cyanobacteria) have contributed to stromatolite formations and calcimicrobial reefs (e.g. in the Neoproterozoic) over shelfal areas (Riding, 2000). The pelagic component has become significant only much more recently, i.e. during the Mesozoic (Boss and Wilkinson, 1991).

Cyanobacteria have been reported as biological contributors for high oversaturation in carbonate of their microenvironment (Thompson et al., 1997). All the proposed cyanobacterial precipitation mechanisms are commonly based on mineral carbonate precipitation reactions linked to cellular physiological processes, according to the *in vivo* cyanobacterial CO₂ assimilation model driven by CCM enhanced photosynthesis (Miller & Colman, 1980; Thompson & Ferris, 1990; Kaplan et al., 1991; Merz, 1992; McConnaughey, 1994; Price et al., 1998; Kaplan & Reinhold, 1999; Badger & Price, 2003). The microscopic observations of organisms embedded in non structured calcite crystals show that the growth of crystals probably happens in the microenvironment of cell outer membranes (Dittrich and Obst 2004).

Cyanobacterial blooms resulting from favourable growth conditions, especially the input of nutrients, are often associated with whiting events, e.g. brief and large CaCO₃ calcification deposition events. Several field studies have stimulated the question on biologically active precipitation with cyanobacteria (Morse et al., 2003). Whiting settings have been extensively studied: for instance the Fayetteville Green Lake (hard water lake) (Thompson and Ferris, 1990; Thompson 1997) and the Great Bahamas Bank (marine environment) (Thompson, 2000)... Sedimentation rates of carbonate precipitates have been estimated from field and experimental data. In Fayetteville Green Lake (FGL), Thomson et al. (1997), on site, measured calcite precipitations between 3.5-4.0 mg per litre in the open water column between the water surface and 2 m below the surface during the spring, and even greater concentrations during the summer with a depth of 8 m. These authors also measured a decrease of the Dissolved Inorganic Carbon (DIC) concentration and inversely an increase of the $\delta^{13}\text{C}$ DIC value in the water column over these periods of spring and summer. This $\delta^{13}\text{C}$ DIC increase was attributed to the selective uptake of $\delta^{12}\text{C}$ for photosynthetic CO₂ fixation by the cyanobacteria bloom, but a concomitant $\delta^{13}\text{C}$ enrichment of the calcium carbonates in the most recent bottom sediments was also observed. The same evolutions of the ¹²C/¹³C isotopes (as observed on FGL site) have successfully been reproduced in laboratory microcosms using

the water and the micro-florae of this site. The differences isotopic values obtained in the calcite (from sediments) and in the DIC (water column) may suggest that the precipitation occurred in chemical microenvironments that were not at equilibrium with the bulk of the lake water. These authors, despite interesting isotopic studies on FGL site, did not present information about carbon partition into biomass and calcite.

Moreover no studies present clearly reliable mass balance for carbon and calcium, the major elements involved in cyanobacterial calcification processes. Merz's pioneer work (1992) on microbial mats has reported an approximate 1:1 ratio of calcification to photosynthesis (around 1 to 1.2 mol carbon fixed in biomass for 1 mol precipitated carbonate) under field conditions. Nevertheless the biomass was not measured directly. Daily variations of alkalinity and calcium have been observed in the interstitial water of the mats in the reported experiments. These variations have been used to indirectly calculate the carbon incorporated in calcium carbonate precipitates. Yates and Robbins (1998) also calculated calcification from initial and post incubation alkalinity, pH, and calcium measurements to determine the ratio between calcification and photosynthesis. These authors mentioned that DIC calculation based on alkalinity and pH variations may not accurately reflect calcification or photosynthesis.

Literature also lacks in information concerning the onset and the extent of CaCO_3 precipitation during active cyanobacterial growth. In order to better understand CaCO_3 precipitation by cyanobacteria, it is crucial to have accurate mass balances of carbon and calcium during the growth. Mass balances are difficult to obtain because the calcified cyanobacteria are a mix of organic and inorganic carbon which is ill-suited for most analytical methods. The purpose of this study was to develop and validate an analytical strategy based on the use of the Rock-Eval 6 (RE6) technique to determine the carbon distribution in calcium carbonate and biomass during cyanobacterial growth on bicarbonate. RE6 is able to determine precisely the organic and inorganic carbon of rocks (Behar et al., 2001), but has never been applied to the quantitative and qualitative characterisation of biological samples thus far. In this study, the RE6 was calibrated with pure cyanobacterial biomass cultivated in calcium deprived medium and pure calcium carbonate. It was utilized for the monitoring of bicarbonate assimilation and CaCO_3 precipitation by the marine calcifying cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC 8806 on various bicarbonate/ Ca^{2+} combination cultures.

Materials and Methods

Cyanobacterial Cultures and Experimental Setup

➤ *Bacterial Strain and Culture Conditions*

The marine calcifying cyanobacterial strain *Synechococcus sp.* PCC 8806 used in this study was maintained on low (0.38 mM) CaCl₂ ASNIII growth medium (Rippka et al., 1979) by transferring 10% (v/v) of the culture to fresh sterile medium every 4 weeks with atmospheric CO₂ as the carbon source.

Experiments were performed in 500 mL clear glass serum bottles equipped with sampling ports and filled with 200 mL of culture medium containing 171 mM NaCl, 17.65 mM NaNO₃, 0.30 mM MgSO₄·7H₂O, 0.18 mM K₂HPO₄, 0.03 mM FeCl₃·6H₂O, and 1 mL Trace Metal Mix A5 + Co (Rippka et al., 1979). The pH of the medium was adjusted to 8.0. NaHCO₃ and CaCl₂ were introduced as variables in the mineral medium. When needed, CaCl₂ was added to the medium prior to autoclaving and NaHCO₃ was added from a sterile stock solution just prior to inoculation.

The culture flasks were inoculated with cyanobacteria to a target concentration of 1×10⁷ cells mL⁻¹ and immediately sealed with a rubber septum and plastic screwed end cap to avoid CO₂ exchange with the atmosphere.

All cultures were grown at 25°C in a plant growth chamber (Snijders, ECD01E) with a 12h/12h light/dark cycle, 1.79 klux photon irradiance, and an agitation rate at 60 rpm.

➤ *End-Point Experiments*

Calcium and bicarbonate were added to the culture medium in variable amounts ranging from 0.34 mM up to 6.8 mM for Ca and from 5 mM to 15 mM for HCO₃⁻. Each assay represented one bicarbonate and one calcium concentration and was performed in triplicate. The headspace composition was at atmospheric conditions; therefore the concentration of oxygen in the headspace at the beginning of each experiment was 21 % (v/v) while that of CO₂ was negligible (less than 10 μmol) compared to the introduced amounts of HCO₃⁻. At the end of the incubation, the whole culture was processed to determine the overall mass balance (see below Sample Preparation).

➤ *Kinetic Experiments*

Kinetic experiments were set up as described for the end-point experiments, except that the initial culture (with inoculum added) was immediately split into sub-cultures. One subculture was sacrificed for analysis at each kinetic time point. Mass balance determination,

especially the analysis of the insoluble content of the culture required the entire content of a culture flask to be processed.

➤ ***Abiotic Precipitation Experiments***

Abiotic precipitation experiments were set up using the same concentrations of bicarbonate and calcium as for the experiments inoculated with cyanobacteria. Abiotic precipitation was performed in mineral medium and in distilled water. The calcite precipitation was initiated by increasing the pH value to 11 with NaOH. Bottles were closed immediately after NaOH addition and analyzed after 7 days exposure in the same way as described below.

➤ ***Sample Preparation***

At the end of each assay, the headspace was sampled before opening the bottle for CO₂ and O₂ quantification. The pH of the culture medium was measured (pH-meter, Mettler Toledo) and the medium was then filtered through a 0.45µm PTFE filter to separate the supernatant from the insoluble matter (cells + calcium carbonate). Filtrate was either analyzed immediately or stored prior to analysis in top-filled tubes at 4°C to avoid re-equilibration of the filtrate with atmospheric CO₂. The insoluble matter was not washed to avoid losses of calcium carbonate and lysis of cells. The bacterial and mineral cake was dried for 24 h at 100°C and stored at +4°C until further analysis.

Analyses

➤ ***Quantification of CO₂ and O₂***

Carbon dioxide and oxygen concentrations in the headspace were measured by gas chromatography (GC) with a thermal conductivity detector on a Varian 3800 chromatograph equipped with a Porapak Q (80/100 mesh, Chrompack) column (2 mm ID, 2 m long) for CO₂ and with a molecular sieve column (80/100 mesh, Altech; 2 mm ID, 2 m long) for O₂. Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 30 mL/min. The operational temperatures for CO₂ analysis were 130°C, 130°C, and 100°C for the injector, detector, and column respectively, and for O₂ analysis were 130°C, 130°C, and 50°C. 250µL of headspace gas were injected. Concentration were calculated from the peak area according to calibration curves obtained with reference gases, e.g. CO₂ 5%v/v ± 0.096 in N₂, (Air Liquide, France) for CO₂, and atmospheric gas (O₂ = 20.9 %v/v) for O₂. Detection limits were 100 nmol and 2 nmol for O₂ and CO₂ respectively.

➤ ***Quantification of Anions and Cations***

The concentrations of cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) and of anions (NO_3^- , NO_2^-) were determined by analysing the filtrate (culture medium samples after filtration on 0.45 μm PTFE filter). Ions were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a DIONEX ICS 3000 equipped with an eluent generator and two self regenerating suppressors (CSRS-ULTRA 4 mm for cation and ASRS-ULTRA 4 mm for anion).

Cations and anions were separated at 30°C on either a DIONEX IonPac CS12 column (4 mm x 250 mm) with 20 mM methanesulfonic acid at a flow rate of 1 mL/min (cations) and on an IonPac AS9-HC column (4 mm x 250 mm) with a gradient of KOH at a flow rate of 1 mL/min respectively (anions) and quantified with a conductivity detector. The volume analyzed was 25 μL (full-loop injection). Linear calibration curves (with $R^2 > 0.999$) were obtained for calcium (0-400 μM), magnesium (0-1000 μM), and nitrate (0-2.5 mM) and a polynomial curve was established for nitrite (0-2.5 mM) with $R^2 > 0.999$. Detection limits were respectively 5 μM , 5 μM , 20 μM , and 50 μM .

➤ ***Quantification of HCO_3^- , CO_3^{2-} and OH^-***

The concentration of bicarbonate, carbonate and OH^- ions were determined by titration with an automatic titrator (Titrimo 702 SM, METROHM). 40 mL of culture medium were analyzed immediately after filtration with a 0.45 μm PTFE filter. The samples were not diluted to avoid changing the ratio of bicarbonate/carbonate due to pH change and atmospheric CO_2 re-equilibration. Titration was performed with 100 μL step volumes of either a 0,01 N H_2SO_4 solution (corresponding to 1 $\mu\text{mol H}^+$) or a 0.001 N solution depending on the expected concentrations of bicarbonate and carbonate. The data were saved by software Tiamo (METROHM). The two inflexion points corresponding to the transitions between carbonate/bicarbonate and bicarbonate/ CO_2 respectively were extracted by the second-derivative method. When OH^- ions are present in the sample, the first inflexion point corresponds to the transitions between carbonate and bicarbonate. In this situation the quantity of H^+ (μmol) added at the first inflexion point represented OH^- neutralization plus carbonate/bicarbonate transition. The detection limits were 5 μmol for CO_3^{2-} , HCO_3^- and OH^- .

➤ ***Quantification of Mineral Carbon (MinC) and Dissolved Organic Carbon (DOC)***

The concentration of Dissolved Organic Carbon (DOC) and Mineral Carbon (MinC) were determined on a TOC 5050 (Shimadzu, Japan). This apparatus uses two lines of analysis, the first line for total carbon (TC) quantification and the second one for mineral carbon (MinC) quantification. DOC was calculated by subtracting MinC from TC. A maximum of 100 μL of filtered growth culture samples prepared as described above, was injected in the TC line where it was completely decomposed to CO_2 and quantified by an infra-red detector. A

maximum of 250 μL of sample was injected in the MinC line where it reacted with a solution of 20% ortho-phosphoric acid (v/v), allowing conversion of both bicarbonate and carbonate to CO_2 which was then quantified using the same IR detector. The TC line was calibrated with a potassium hydrogenophthalate solution ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) between 0 and 83 mM. The MinC line was calibrated with a carbonate/bicarbonate solution (50/50, w/w) between 0 to 41 mM. The ranges of detection were 50 ppb to 4,000 ppm and 50 ppb to 5,000 ppm for TC and MinC respectively.

➤ ***Elemental analysis of cyanobacterial cells***

The elemental composition of the cyanobacterial cells was determined according to the ASTM 5991 method. Biomass from calcium deprived cultures was harvested by centrifugation, and then carefully washed with a 9% NaCl solution to eliminate salts from the culture medium. Washed biomass was dried at 80°C and carefully crushed in a mortar. The C, N, H analysis, the O analysis and the S analysis needed each approximately 1-3 mg of sample.

➤ ***Rock Eval 6 Analysis***

The concentration of carbon present in the biomass and in the calcium carbonate was quantified by Rock Eval 6 analysis (RE 6, Vinci Technologies, France). The dried insoluble matter (biomass plus calcium carbonate) was introduced in a crucible. This dry insoluble matter was first analyzed with the pyrolysis cycle and then with the oxidation cycle as described by Behar et al. (2001). The pyrolysis cycle was operated with nitrogen as carrier gas (in absence of oxygen). Oven temperature conditions were a steady 300°C for 3 min followed by an increase at a rate of $25^\circ\text{C min}^{-1}$ to reach 650°C . The oxidation cycle was then operated on the residue from the pyrolysis cycle, in the presence of oxygen. Oven temperature conditions were a steady 300°C for 1 min, followed by an increase at a rate of $20^\circ\text{C min}^{-1}$ to reach 850°C .

The biomass is quantitatively decomposed into volatile compounds (in a hydrocarbon type form) detected by the flame ionization detector (FID) during the pyrolysis cycle and into CO and CO_2 detected with the infrared detector during both the pyrolysis and oxidation cycles. The calcium carbonate is only decomposed into CO and CO_2 during the two RE6 analytical steps: pyrolysis and oxidation. Cyanobacterial biomass cultivated on medium without calcium (also used for elemental analysis) and calcium carbonate (purity > 98%, VWR) are taken as analytical standards to optimize the pyrolysis/oxidation cycles and to calibrate the respective C_{Biomass} and C_{CaCO_3} quantifications.

The post oxidation residue (mass weighted in the crucible after pyrolysis and oxidation cycles) was systematically measured.

➤ **Scanning Electron Microscopy**

Cyanobacterial cells and CaCO₃ minerals were imaged with a Scanning Electron Microscopy (JEOL, Netherlands). The cells and calcium carbonate were filtered from the cyanobacterial cultures. The filter was suspended for 1 hour in a 2.5 % glutaraldehyde solution (v/v) for fixation. After fixation, the insoluble matter (biomass plus calcium carbonate) was recovered by centrifugation and washed 3 times in a phosphate buffer (pH 7.4) to remove the residual glutaraldehyde and the remaining salts and then filtered again with a 0.45 μm PTFE filter. The fixed insoluble matter was recovered from the filter and dried at 40°C for 24 hours. After that samples were sputter coated with 10 nm gold before SEM imaging.

Results and Discussions

Calibration of the Rock Eval 6 analysis

The ability of the Rock Eval 6 (RE 6) analysis to precisely quantify a mixture of organic carbon (OC) and inorganic carbon (IC) was tested by analyzing biomass (grown on culture medium without calcium), calcium carbonate (purity > 98%) and mixtures of biomass plus calcium carbonate in various proportions. The elemental composition of the biomass of *Synechococcus sp.* PCC 8806 grown on maintenance culture medium (0.38 mM calcium) was: 45.9% C, 6.8% H, 8.9% N, 31.2% O and 0.6% S ($C_4H_{7.13}O_{2.04}N_{0.66}S_{0.02}$).

The OC response occurred at 53 % C (w/w) in the pyrolysis cycle and 47 % C (w/w) in the oxidation cycle respectively (Figure 1). A linear correlation between biomass and organic carbon (OC) analyzed by RE 6 was established over a range of biomass from 0 to 20 mg:

$$OC = 33.8 \times \text{biomass} + 9.1 \quad (R^2 > 0.9999) \quad (\text{equation 1})$$

where OC is expressed in μmol of carbon and biomass in mg.

The IC response was observed essentially during the oxidation cycle (97%) (Figure 1). A linear correlation between calcium carbonate (CaCO₃) and inorganic carbon (IC) analyzed by RE6 was obtained over a range of calcium carbonate from 0 to 60 mg:

$$C = 10.92 \times \text{CaCO}_3 - 6.66 \quad (R^2 > 0.9999): \quad \text{equation 2,}$$

where IC is expressed in μmol of carbon and CaCO₃ in mg.

Three mixtures of biomass and calcium carbonate were analyzed by RE 6, ranging from 7 mg to 15 mg for biomass and from 7 mg to 60 mg for CaCO₃. The IC ($\approx C_{\text{CaCO}_3}$) and OC (C_{Biomass}) values (μmol C) obtained for these three mixtures are presented in Table 1, as

well as the respective quantities (mg) of biomass and CaCO_3 , calculated from the data using the two equations 1 and 2. CaCO_3 calculated values were systematically slightly overestimated ($\approx +2\%$ for 30 mg CaCO_3 introduced), while biomass was systematically slightly underestimated ($\approx -1\%$ for 15 mg biomass introduced). Since the divergences remained low, we considered the RE 6 analysis as appropriate to accurately estimate the inorganic and organic carbon in the dry insoluble matter (biomass plus calcium carbonate).

Carbon and Calcium Mass Balances in Cyanobacterial Cultures

This analytical protocol was applied to obtain precise calcium and carbon mass balances in cyanobacterial cultures. Experiments were setup in triplicates with different initial concentrations of bicarbonate (sole carbon source) and calcium. These ranged from 5 to 15 mM and 0.34 to 6.8 mM respectively (Table 2). These cultures were analyzed after total disappearance of bicarbonate in the growth medium, which corresponded to the end of photosynthetic growth in our closed experimental reactor. Cultures were also analysed immediately following inoculation (on additional replicates).

The concentration of DOC, MinC, bicarbonate, carbonate, hydroxyl ions and soluble calcium were determined in the filtrate. For each assay, the totality of the insoluble matter recovered by filtration was analyzed by RE 6. The mass recovery for the RE 6 analysis was systematically verified: the sum of biomass (mg), calcium carbonate (mg) and residue (mg) obtained from the RE 6 data was compared with the weight of the dry insoluble matter introduced in the crucible. The post oxidation residue (residual mass of the crucible after pyrolysis and oxidation cycles) was systematically measured in all samples and corresponded mainly to mineral salts originated from the culture medium (including calcium). This residue was also observed in abiotic CaCO_3 precipitation controls performed on salt medium culture but not in distilled water. All samples analyzed presented a RE 6 mass recovery ranging between 99 and 109 % (w/w) (Table 2).

Carbon and calcium balances were determined by comparing the carbon and calcium present at the beginning and at the end of the experiment. The carbon balance was performed as following. The carbon initially present in the form of both dissolved organic carbon and biomass introduced by the inoculum and in the form of bicarbonate and carbonate present in the culture medium was compared to the carbon present at the end of the experiment and distributed between an insoluble organic and inorganic matter, measured by RE 6, and a soluble bicarbonate, carbonate and dissolved organic carbon in the filtrate. The calcium balance was performed as following. The calcium present at the beginning of the experiment

in form of soluble ion (Ca^+) was compared to the calcium present at the end of the experiment, while a part of it is present as soluble ion (Ca^{2+}) in the growth medium and a remaining part is present as CaCO_3 in the insoluble matter. Assuming that all the carbonate precipitated in the form of CaCO_3 , the insoluble calcium fraction can be extrapolated from the inorganic carbon measured by RE 6, according to the CaCO_3 stoichiometry.

The cultures presented carbon mass balances ranging from 92 to 107% and calcium mass balances from 83 to 107%. The data presented in Table 2 clearly show carbon and calcium balances with a precision $< 5\%$ when combining the RE 6 with the other analytical methods. It is thus possible to monitor precisely the carbon partition during cyanobacterial growth and concomitant CaCO_3 precipitation.

Kinetic Parameter Evolutions During Growth on Bicarbonate

Three series of assays with various initial calcium concentrations, 0.34, 3.4 and 6.8 mM and bicarbonate concentrations, 2.5, 5 and 7.5 mM were performed. The evolution of pH, bicarbonate, carbonate, calcium, hydroxyl ion, DOC, biomass and calcium carbonate were monitored during the experiment. Figure 2a presents a representative example for a culture supplemented with $1,500 \mu\text{mol HCO}_3^-$ (7.5 mM) and $1,360 \mu\text{mol CaCl}_2$ (6.8 mM) monitored over 15 days. As bicarbonate is rapidly used for cyanobacterial growth, the pH of the medium increased to reach ca. 11.3 after 5 days at which point it remained stable. Bicarbonate is completely consumed after 6 days. During these 6 days, a rapid decrease of Ca concentration due to CaCO_3 precipitation in the growth medium was observed. In all kinetic experiments, the bicarbonate was always completely utilized regardless of the quantity introduced (1,000 to 3,000 μmol). Thereafter, OH^- alkalinity was systematically measured, as already reported by Lee *et al.*, (2004).

The biomass production and calcium carbonate precipitation during bicarbonate assimilation are presented in Figure 2b. Both the production of biomass and precipitation of calcium carbonate finished on day 6. DOC was analysed immediately after inoculation and was found to be constant during the cyanobacterial growth, but increased after the complete disappearance of the bicarbonate. This suggests that cell lysis occurred rapidly at the end of the growth phase. The cell lysis could explain the variable initial DOC charge (around 100 to 150 $\mu\text{mol C}$) for the different cultures, which could depend on both the age and the volume of the inoculum used.

For 7.5 mM bicarbonate, the maximal optical density (at 600 nm) was ≈ 0.5 which corresponded to $\approx 100 \text{ mg/L}$ of biomass (dry matter). For these absorbance values, photo-

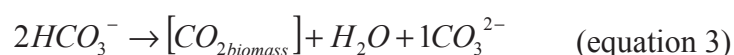
limitation was very moderate (data not shown). The smallest generation time (G) was greater than 1 day and was obtained during the first days of culture.

Conversion Ratio of Bicarbonate into Biomass and Calcium Carbonate

Synechococcus biomass growth appeared independent of the calcium concentration in the growth medium (Figure 3a). Indeed the HCO_3^- assimilation and the carbonate production (expressed as the sum $\text{CO}_3^{2-} + \text{CaCO}_3$) appeared independent of the calcium concentration in the growth medium (between 0.34 and 6.8 mM) (Figure 3b and 3c). In this kinetic study the carbon balance has been calculated without taking into account the DOC that strongly impacted the OC distribution due to biomass lysis in prolonged experiments (see data presented in Table 2). The C balances measured during the growth phase (expressed as the sum $[\text{C}_{\text{biomass}} + \text{C}_{\text{CO}_3^{2-}} + \text{C}_{\text{CaCO}_3}] / \text{C}_{\text{HCO}_3^- \text{ consumed}}$) are presented in the Figure 3d for the assays with 7.5 mM bicarbonate and various calcium concentrations (0.34; 3.4 and 6.8 mM). The carbon and calcium balances obtained were around 97/103 %, excepted for the first points (first day and some data for the second day). The relevance of the carbon balance values for these early points in this kinetic study may be questioned since very low biomass and carbonate are produced and low bicarbonate consumed.

The ratio between $\text{C}_{\text{biomass synthesized}}$ and $\text{C}_{\text{carbonates produced}}$ (expressed as the sum of $\text{CO}_3^{2-} + \text{CaCO}_3$) is presented in the Figure 3d. Since the production of *Synechococcus* biomass is independent of the calcium concentration, this ratio has been calculated by combining all the data from the experiments undertaken with the three different calcium concentrations (0.34; 3.4 and 6.8 mM). Just before the complete bicarbonate assimilation, this ratio increased from ≈ 0.46 to ≈ 0.52 . This upward tendency at the end of the growth could reflect the indirect use of carbonate as carbon source for biomass production. In fact, in batch conditions, the reversible equilibrium between the two carbonate species regenerates bicarbonate which is incorporated into the biomass, despite the low bicarbonate concentration predicted by DIC, H^+ (pH), pK_1^* and pK_2^* values (* denotes stoichiometric equilibrium constant). In this condition, hydroxyl ions are detected, due to the chemical conversion of carbonate to bicarbonate (necessary for the charge balance) and the assimilation of bicarbonate. Nevertheless the lysis phenomenon observed systematically in batch conditions when the bicarbonate was completely consumed suggested a possible inhibition of the cyanobacterial growth at pH upon 11, limiting the carbonate fraction re-used. These conclusions highlighted the difficulties to precisely determine the ratio between biomass and carbonate (as free carbonate + CaCO_3) when using bicarbonate as sole carbon source. Nevertheless, to our

knowledge, this is the first time detailed experimental mass balance data on carbon assimilation are reported with bicarbonate as carbon source, in presence and in absence of calcium in the growth medium. This ratio is still fairly close to the predicted value of 0.5, reinforced cyanobacterial CO₂ assimilation model driven by CCM enhanced photosynthesis. One bicarbonate ion is incorporated into biomass generating a hydroxyl ion which reacts with a second bicarbonate to form carbonate as per equation 3:



CaCO₃ Precipitation during Growth

The carbonate produced during the growth of *Synechococcus* can react with the dissolved calcium present in the growth medium and form CaCO₃. In the presence of high calcium concentrations (3.4 and 6.8 mM), the green colour of the cyanobacteria rapidly faded and the culture turned cloudy white due to the formation of fine grains of CaCO₃. A strong reduction of dissolved calcium concentration occurred simultaneously with the precipitation of calcium carbonate and was well correlated to the quantity of calcium present in the precipitated CaCO₃ (Figure 2). Scanning Electron Microscopy (SEM) imaging of the cells and precipitates show that the cyanobacterial cells were embedded in calcium carbonate aggregates of rhomboidal and irregular forms (Figures 4a, 4b). For the lowest calcium concentration tested (0.34 mM), the aged culture turned yellow and the calcium carbonate precipitation was not visible to the eye. For this CaCl₂ concentration, the very low quantity of CaCO₃ detected is within the range of the detection limit. In our experimental conditions, as mentioned before, the kinetic of biomass production was independent of the calcite precipitation, strongly suggesting that the CaCO₃ precipitation by the cyanobacteria is constrained by environmental, not physiological, factors. In fact for a same initial bicarbonate concentration (7.5 mM), the higher the CaCl₂ concentration, the quicker the CaCO₃ precipitation occurred. CaCO₃ precipitation appeared after 2/3 days and 3/4 days for CaCl₂ concentrations of 6.8 and 3.4 mM respectively (data not shown)

The CaCO₃ precipitation during cyanobacterial growth has been systematically quantified. According to stoichiometry the maximal CaCO₃ masses that could be obtained are constrained by the limiting specie present in the medium: calcium or carbonate. The carbonate production was estimated using a bicarbonate conversion ratio of 0.5 during photosynthetic bicarbonate assimilation. In all combinations of bicarbonate with CaCl₂, the quantities of CaCO₃ precipitated were systematically lower than the maximal possible values from the

stoichiometric point of view. In addition, soluble calcium and carbonate were systematically present at the end of the growth experiments.

For example, it has been shown that an initial bicarbonate concentration in the culture medium of 7.5 mM would generate at the end of the *Synechococcus sp.* PCC 8806 growth about 3.75 mM of carbonate. With initial calcium concentrations of 3.4 and 6.8 mM the culture conditions represent respectively a case where the calcium and carbonate concentrations are stoichiometrically in the same order of magnitude, and one case with an excess of calcium. Data shown in Figure 5 show that the CaCO₃ precipitated averaged ca. 331 and 572 μmol respectively, lower than the maximal possible values expected to be 620 and 697 μmol respectively.

Abiotic CaCO₃ precipitation controls were performed in approximately the same range of Ca²⁺ and CO₃²⁻ concentrations as used for the growth experiments. They were done in mineral growth medium and also in distilled water. For the experiments performed in distilled water, the amount of CaCO₃ precipitated was close to the expected values. For the abiotic controls performed with mineral growth medium, the amounts of precipitate were systematically lower than the theoretically expected values. These differences observed in the abiotic controls (in water or in mineral medium) can be attributed to ion activities. The shape of the crystals in the abiotic control experiments differs from that of those observed in the biotic assays, and are on the order of a few microns in the typical calcite rhombohedral form (Figure 4c).

The quantities of calcium carbonate precipitated in the abiotic and biotic experiments are presented in the Figure 5. For calcium concentrations of 6.1/6.6 mM, two abiotic and one biological experiments represented situations with calcium ions present in stoichiometric excess. The CaCO₃ quantities precipitated represented in all essays about 80 % of the maximal CaCO₃ quantity that can precipitate whatever the carbonate concentration (from 2.5 to 5.0 mM). The differences obtained could be attributed to the ion activity of the growth medium. For calcium concentrations of ≈ 3.2 mM, two abiotic and one biotic experiment represented situations with carbonate ions present in stoichiometric excess. In these conditions the CaCO₃ quantities precipitated increased progressively from 53 to 78% (of the maximal CaCO₃ quantities that can precipitate) with rising carbonate concentrations (from 2.5 to 7.5 mM). These differences, mainly for the two lowest carbonate concentrations could not be attributed only to the ion activity, but reflect also that the CaCO₃ precipitation is also governed by both calcium and carbonate concentrations. This reinforces that, in biological

experiments conducted in batch conditions, the calcium carbonate precipitated is mainly governed by calcium and carbonate concentrations, as in abiotic controls.

Conclusions

This study reports the use of the Rock Eval 6 analysis for identification and quantification of organic and inorganic carbon in cyanobacterial cultures of the strain *Synechococcus sp.* PCC 8806 using bicarbonate as the sole carbon source. The experiments have been undertaken with or without calcium. This technique has made it possible to obtain unprecedented mass balance analyses for the two major elements, e.g. carbon and calcium, involved in cyanobacterial photosynthesis and calcification. The recovery of each element ranged from ca. 90 to 100%. Accurate mass balances obtained experimentally confirm the proposed 1:1 partitioning ratio between C_{biomass} and $C_{\text{carbonate+CaCO}_3}$ produced during photosynthesis and precipitation on bicarbonate. Nevertheless, it is crucial to precisely describe the culture conditions in which this ratio is obtained, since chemical equilibria of carbonate are greatly affected by these culture conditions. The biomass produced was independent of the calcium concentration in the growth medium and the calcification appeared as an indirect consequence of the cyanobacterial photosynthetic activity. In closed growth conditions, it could be shown that the quantities of CaCO_3 precipitated are systematically lower than maximal possible quantities according to CaCO_3 stoichiometry, regarding the most limiting species. Moreover it has been shown that the CaCO_3 precipitation occurred quicker with increasing initial calcium concentration suggesting strongly that the precipitation of CaCO_3 during cyanobacterial growth is constrained by chemical factors, mainly the respective concentrations of Ca^{2+} and CO_3^{2-} .

Ecological Implications

Favourable growth conditions can lead to cyanobacterial blooms which are often associated with whiting events which corresponds to an associated calcium carbonate precipitation. Fayetteville Green Lake (a hard water Lake) and the Great Bahamas Bank (a marine environment) are two whiting settings that have been extensively studied (Thomson et al., 1997). Moreover, in cyanobacterial mats, two factors have been found to drive biological calcification (Merz, 1992): bicarbonate uptake and suitability of the bacterial sheath as a nucleation site for calcium carbonate. The present study demonstrates that the assimilation of two bicarbonate ions during photosynthesis yields the production of one carbonate ion in the environment, as proposed previously (Paasche, 1964; Merz, 1992), reinforcing carbonate

oversaturation in the immediate vicinity of the outer membranes of the cyanobacterial cells. Biofilms dominated by cyanobacteria, as in mats, offer micro-environmental niches in which interstitial water composition may be dramatically altered during photosynthesis. This could result in water alkalization that is primarily driven by bicarbonate assimilation. The results of this paper obtained in closed cultures fully support this hypothesis.

Fayetteville Green Lake (FGL) (Thomson et al., 1997) may be considered as an intermediate situation between close and large open environmental systems. In this hard lake, higher DIC values than in marine waters are observed and vary during the spring and summer seasons. Moreover the proofs for precipitation of calcium carbonate appeared very convincing.

Oppositely, in marine whiting, the calcium carbonate oversaturation in the bulk solution is repeatedly questioned. In these large open systems, it is questionable if the pH values are modified because their values as well as the bicarbonate and carbonate concentrations are considered to be constant. In the case of the Great Bahama Bank, no pH differences were noted for the water, inside or in vicinity of the whittings (Morse et al., 2003), suggesting that whiting induced by cyanobacteria are probably much more complex and still not completely understood (Thompson, 2000). Perhaps different mechanisms rule the precipitation of calcium carbonate *in vitro* and *in vivo*. Nevertheless the precipitation events in natural whiting despite non-alkalization of the environment were probably regulated both by the calcite saturation state Ω and nucleation sites. Obst et al. (2009) have demonstrated the evidence of a preeminent role of bacterial surface in CaCO_3 nucleation. In natural environments, such nucleation surfaces may also originate in the form of small calcite crystals or organic particles (as EPS, ...) during the upwelling events, which could prompt the cyanobacterial blooms (Morse et al., 2003; Morse and Mackenzie, 1990).

It would be interesting to re-examine the precipitation onset and extent with a calcium concentration close to that in seawater.

The basic data presented in this paper will find future application in three fields: (1) a better understanding of the carbon cycle and in particular for quantifying the role of cyanobacteria as carbon sink in relation to global warming; (2) a better understanding of the carbonated sedimentary records in marine and lacustrine environments; (3) the definition of industrial cyanobacterial cultures for concomitant biomass production and calcium carbonate precipitation as an industrial solution for renewable energy supply and long term mineral carbon storage.

Acknowledgements

Authors wish to thank Nicole Tandeau de Marsac from Institut Pasteur, Paris for providing the pure cyanobacteria strain *Synechococcus sp.* PCC 8806. We would also like to thank Véronique Bardin for outstanding technical assistance in microbial cultures, Gérémie Letort for Rock Eval analysis and Bertrand Van De Moortele for scanning electron microscopy imaging.

CONFIDENTIEL

References

- Badger, M.R., Price, G.D., 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* 54, 609-622.
- Behar, F., Beaumont, V., De Barros Pentead, H.L., 2001. Rock-Eval 6 Technology: Performances and Developments. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 56, 111-134.
- Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., McClain, C.R., Feldman, G.C., Los, S.O., Tucker, C.J., Falkowski, P.G., Field, C.B., Frouin, R., Esaias, W.E., Kolber, D.D., Pollack, N.H., 2001. Biospheric Primary Production During an ENSO Transition. *Science* 291, 2594-2597.
- Boss, S.K., Wilkinson, B.H., 1991. Planktogenic/Eustatic Control on Cratonic/Oceanic Carbonate Accumulation. *The Journal of Geology* 99, 497-513.
- Buitenhuis, E.T., De Baar, H.J.W., Veldhuis, M.J.W., 1999. Photosynthesis and calcification by *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) as a function of inorganic carbon species. *Journal of Phycology* 35, 949-959.
- Dittrich, M., Kurz, P., Wehrli, B., 2004. The role of autotrophic picocyanobacteria in calcite precipitation in an oligotrophic lake. *Geomicrobiology Journal* 21, 45-53.
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200-206.
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V.J., Millero, F.J., 2004. Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science* 305, 362-366.
- Kaplan, A., Reinhold, L., 1999. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 539-570.
- Kaplan, A., Schwarz, R., Liemanhurwitz, J., Reinhold, L., 1991. Physiological and Molecular Aspects of the Inorganic Carbon-Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Plant Physiology* 97, 851-855.
- Lee, B.D., Apel, W.A., Walton, M.R., 2004. Screening of cyanobacterial species for calcification. *Biotechnology Progress* 20, 1345-1351.
- McConnaughey, T.A., 1994. Calcification, photosynthesis and global carbon cycles. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, N° special 13.
- McConnaughey, T.A., Whelan, J.F., 1997. Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. *Earth-Science Reviews* 42, 95-117

McConnaughey, T.A., Falk, R.H., 1991. Calcium-Proton Exchange During Algal Calcification. *Biological Bulletin* 180, 185-195.

Merz, M., 1992. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* 26, 81-101.

Miller, A.G., Colman, B., 1980. Evidence for HCO_3^- Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocystris*. *Plant Physiology* 65, 397-402.

Millero, F.J., 1995. Thermodynamics of the carbon dioxide system in the oceans. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 661-677.

Morse, J.W., Gledhill, D.K., Millero, F.J., 2003. CaCO_3 precipitation kinetics in waters from the great Bahama bank: Implications for the relationship between bank hydrochemistry and whittings. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2819-2826.

Morse, J.W., Mackenzie, F.T., 1990. *Geochemistry of sedimentary carbonates*. Elsevier (Amsterdam).

Obst, M., Wehrli, B., Dittrich, M., 2009. CaCO_3 nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for a passive, surface-induced mechanism. *Geobiology* 7, 324-347.

Paasche, E., 1964. A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus.Huxleyi*. *Scandinavian Society for Plant Physiology (Lund)*

Price, D., G., Sultemeyer, D., Klughammer, B., Ludwig, M., Badger, R., M., 1998. The functioning of the CO_2 concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Canadian journal of botany* 76, 973–1002.

Riding, R., 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial–algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47, 179-214.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111, 1-61.

Rost, B., Riebesell, U., Burkhardt, S., Sultemeyer, D., 2003. Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 48, 55-67.

Sorrosa, J.M., Satoh M., Shiraiwa Y., 2004. Low Temperature Stimulates Cell Enlargement and Intracellular Calcification of Coccolithophorids. *Marine biotechnology* 7, 128–133.

Thompson, J.B., 2000. Microbial whittings, in: Riding, R., Awramik, S.M. (Eds.), *Microbial Sediments*. Springer, Verlag, Berlin, pp. 251-260.

Thompson, J.B., Ferris, F.G., 1990. Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water. *Geology* 18, 995-998.

Thompson, J.B., Schultze-Lam, S., Beveridge, T.J., Des Marais, D.J., 1997. Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography* 42, 133-141.

Westbroek, P., Brown, C.W., Bleijswijk, J.v., Brownlee, C., Brummer, G.J., Conte, M., Egge, J., Fernández, E., Jordan, R., Knappertsbusch, M., Stefels, J., Veldhuis, M., van der Wal, P., Young, J., 1993. A model system approach to biological climate forcing. The example of *Emiliana huxleyi*. *Global and Planetary Change* 8, 27-46.

Yates, K.K., Robbins, L.L., 1998. Production of carbonate sediments by a unicellular green alga. *American Mineralogist* 83, 1503-1509.

Yates, K.K., Robbins, L.L., 1999. Radioisotope tracer studies of inorganic carbon and Ca in microbially derived CaCO₃. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 129-136.

CONFIDENTIAL

Table Captions

Table 1: Determination of Biomass and CaCO_3 added as mixtures by Rock Eval 6 analysis

Table 2: Carbon and Ca balances and distributions after complete bicarbonate assimilation. Experiments with various bicarbonate and calcium concentrations.

CONFIDENTIAL

Figure Captions

Figure 1: Rock-Eval 6 analysis of Biomass, CaCO₃ and mixture of biomass plus CaCO₃; Pyrolysis and oxidation responses.

Figure 2: Cyanobacterial growth on bicarbonate (1500 μmol) with CaCl₂ (1360 μmol).

(a) pH, bicarbonate, carbonate, calcium, hydroxyl; (b) C_{Biomass}, C_{CaCO₃}, DOC.

Figure 3: Bicarbonate assimilation (a), biomass production (b) and carbonate + CaCO₃ production (c) during growth on bicarbonate. Experiments with 7.5 mM bicarbonate and variable calcium concentrations (0.34, 3.4 and 6.8 mM Ca. (d) ratio: C_{Biomass}/(C_{Biomass}+C_{CO₃}+C_{CaCO₃}); C balance: (C_{Biomass}+C_{CO₃}+C_{CaCO₃})/C_{HCO₃⁻}.

Figure 4: SEM images of filtered insoluble matter; (a) and (b) CaCO₃ precipitates and cells in cyanobacterial growth cultures; (c) abiotic CaCO₃ precipitates.

Figure 5: Production of CaCO₃ with abiotic controls and biological assays. (Squares represented abiotic controls and circles biological assays).

CONFIDENTIAL

Table 1: Determination of Biomass and CaCO₃ added as mixtures by Rock Eval 6 analysis

	CaCO ₃ introduced mg	Biomass introduced mg	Mineral Carbon (RE data) μmol	Organic Carbon (RE data) μmol	CaCO ₃ calculated* mg	Biomass calculated* mg
1	7.0	7.0	72.1	238.6	7.2	6.8
2	30.2	10.2	329.5	347.4	30.8	10.0
3	59.7	15.2	651.0	515.4	60.2	15.0

* Calculated from RE data

Table 2: Carbon and calcium mass balances and distribution after complete bicarbonate assimilation. Experiments with various initial bicarbonate and calcium concentrations.

Conditions	Initial			Final			Balance			
	Bicarbonate + carbonate μmol	Calcium μmol	C Biomass (*) μmol	CaCO ₃ μmol	Carbonate μmol	Calcium μmol	Carbon balance %	Calcium balance %	RE Mass recovery %	CaCO ₃ /theoretical CaCO ₃ %
Calcium 0.34mM/HCO₃- 7.5mM										
Mean value	1505	67	1032	12	580	49	107	91	102	17
SD	0	0	46	1	95	3	6	3	3	2
SD (% M value)	0	0	4	13	16	7	6	3	3	13
Calcium 0.34mM/HCO₃- 15mM										
Mean value	2975	66	1567	14	1470	57	102	107	107	22
SD	0	0	55	10	17	2	1	17	3	16
SD (% M value)	0	0	3	72	1	4	1	15	3	72
Calcium 3.4mM/HCO₃- 7.5mM										
Mean value	1495	590	993	339	93	234	96	97	105	58
SD	0	0	123	7	3	15	2	3	1	1
SD (% M value)	0	0	12	2	3	6	2	3	1	2
Calcium 6.8mM/HCO₃- 5mM										
Mean value	1060	1243	657	296	75	922	97	98	104	54
SD	0	0	17	38	5	15	4	3	2	7
SD (% M value)	0	0	3	13	7	2	4	3	2	13
Calcium 6.8mM/HCO₃- 7.5mM										
Mean value	1620	1231	862	550	103	657	94	98	105	66
SD	0	0	23	35	16	31	2	1	4	4
SD (% M value)	0	0	3	6	16	5	2	1	4	6
Calcium 6.8mM/HCO₃- 7.5mM										
Mean value	1460	1243	867	527	62	650	100	95	109	69
SD	0	0	27	14	14	17	0.4	0.4	1	2
SD (% M value)	0	0	3	3	23	3	0.5	0.4	1	3

*C Biomass = CBiomass (RE) + DOC(final - initial)

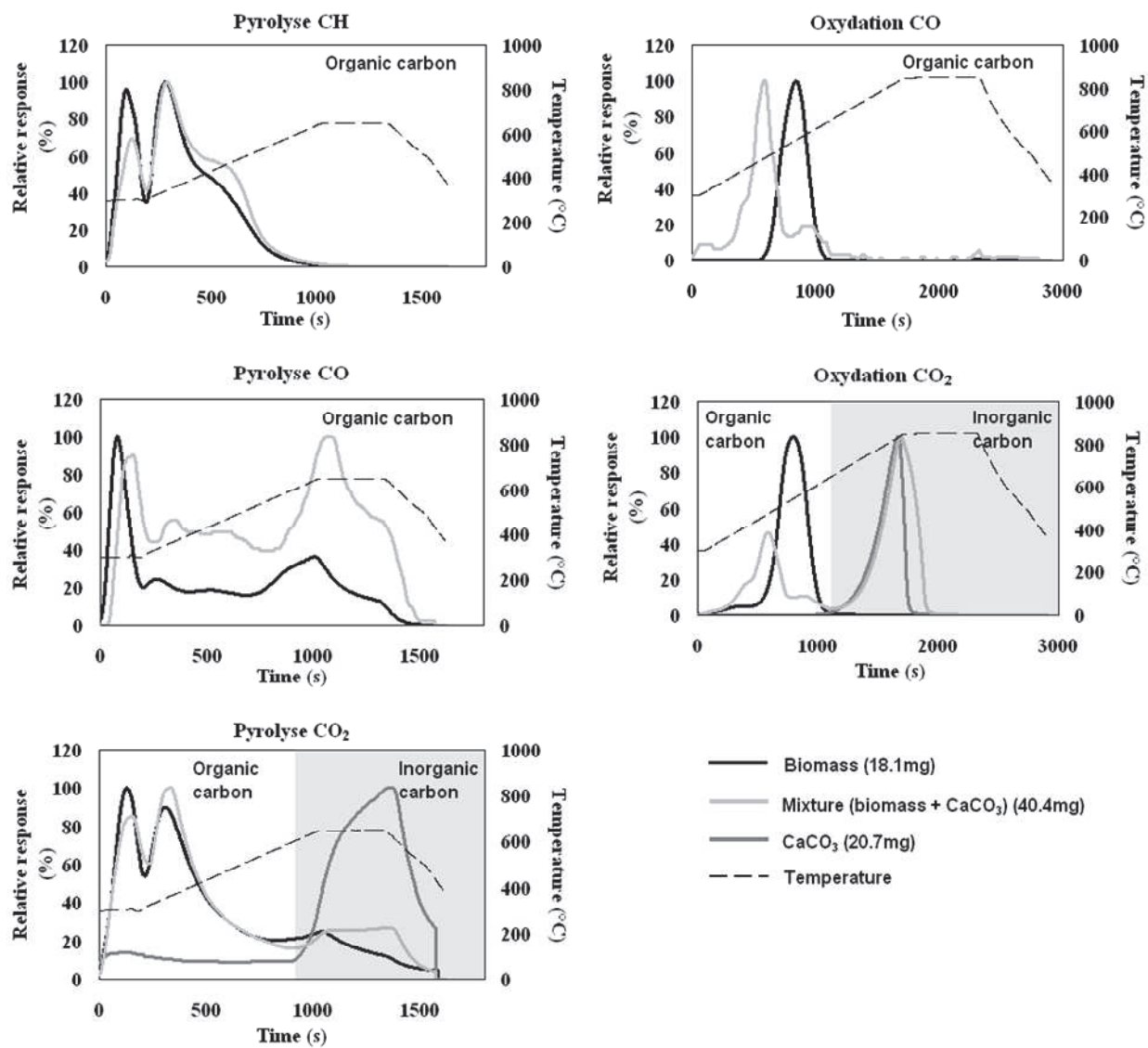


Figure 1: Rock-Eval 6 analysis of Biomass, CaCO₃ and mixture of biomass plus CaCO₃: Pyrolysis and oxidation responses.

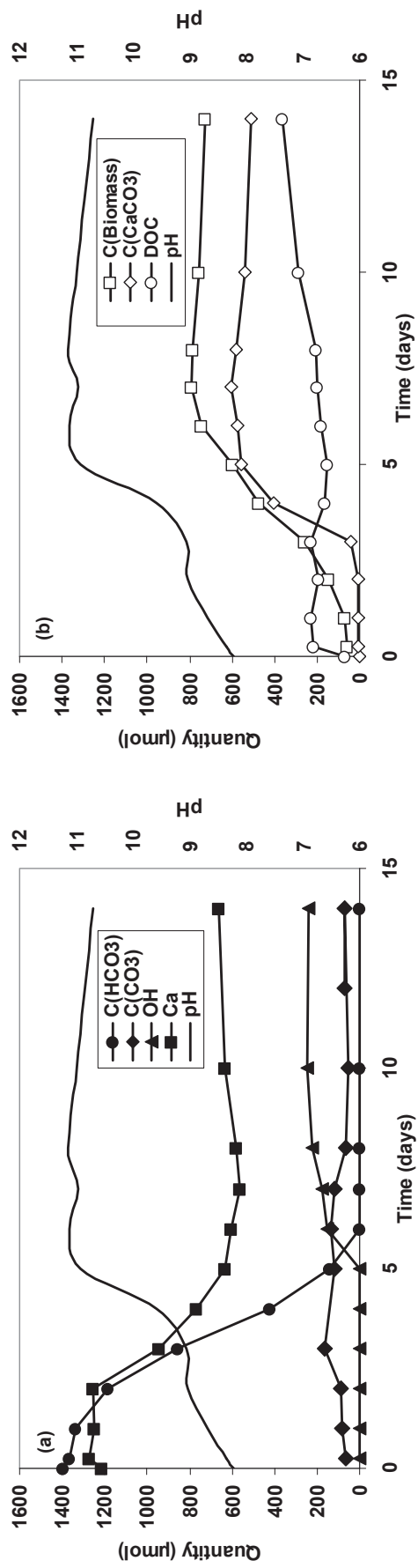


Figure 2: Cyanobacterial growth on bicarbonate (1500 µmol) with CaCl₂ (1360 µmol).
 (a) pH, bicarbonate, carbonate, calcium, hydroxyl ; (b) C_{Biomass}, C_{CaCO₃}, DOC.

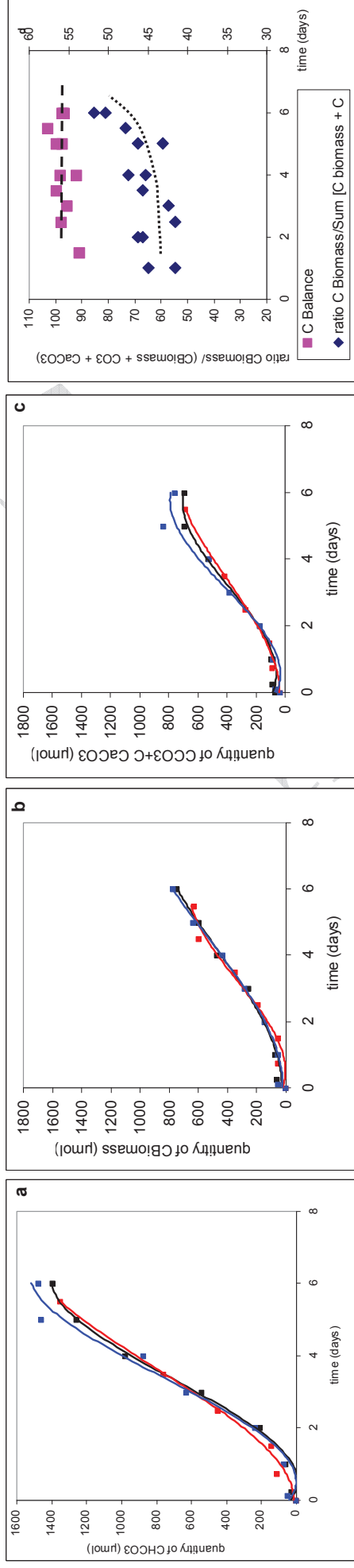


Figure 3: Bicarbonate assimilation (a), biomass production (b) and carbonate + CaCO_3 production (c) during growth on bicarbonate. Experiments with 7.5 mM bicarbonate and variable calcium concentrations (0.34, 3.4 and 6.8 mM Ca. (d) ratio: $\text{C}_{\text{Biomass}} / (\text{C}_{\text{Biomass}} + \text{C}_{\text{CO}_3} + \text{C}_{\text{CaCO}_3})$; C balance: $(\text{C}_{\text{Biomass}} + \text{C}_{\text{CO}_3} + \text{C}_{\text{CaCO}_3}) / \text{C}_{\text{HCO}_3^-}$.

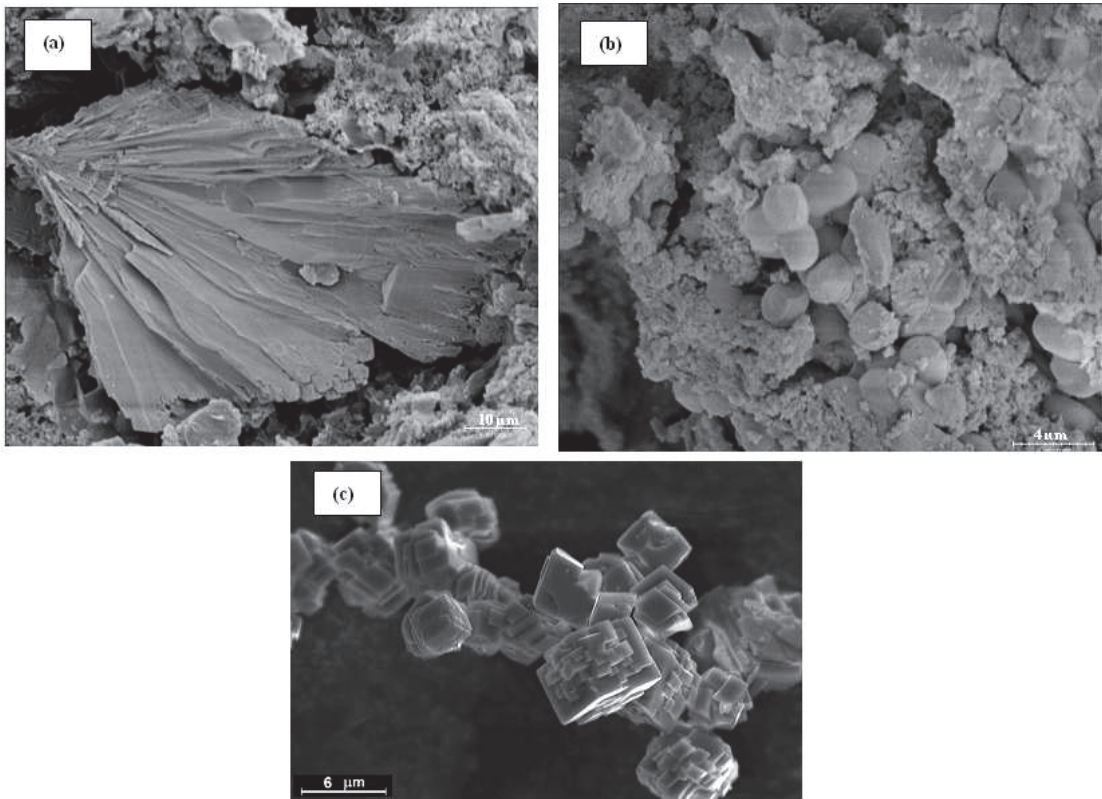


Figure 4: SEM images of filtered insoluble matter; (a) and (b) CaCO₃ precipitates and cells in cyanobacterial growth cultures; (c) abiotic CaCO₃ precipitates.

CONFIDENTIAL

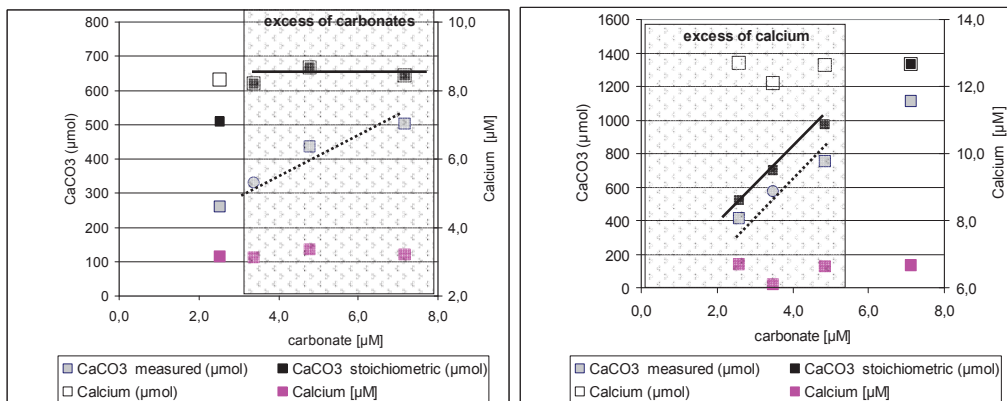


Figure 5: Production of CaCO_3 with abiotic controls and biological assays. (Squares represented abiotic controls and circles biological assays).

CONFIDENTIAL

4.2 Calcite precipitation during growth of *Synechococcus* sp. strain PCC 8806

Introduction

Calcium carbonate precipitation is a key process in the carbon cycle in marine and lacustrine environments (Merz-Preiß, 2000). A large number of studies have been published where the potential for cyanobacteria for calcite production is described (Lee et al., 2004). Two different cases are often cited as examples of massive, biologically-induced carbonate precipitation events, referred to as "whitings" in hard-lake and marine environments: the Fayetteville Green Lake (Thompson and Ferris, 1990, Thompson et al., 1997) and the Great Bahama Bank (Thompson, 2000; Morse et al., 2003). The whitings are composed of suspended fine-grained carbonate particles. In the Fayetteville Green Lake (FGL), blooms of cyanobacterial picoplankton are reported to be associated with the CaCO₃ precipitation events (Thompson et al., 1997). Furthermore isotopic evidences, mainly $\delta^{13}\text{C}$ enrichment of the calcite sediment suggested that the calcite precipitation is a biologically-mediated process (Thompson et al., 1997). The situation encountered in marine environments is more confused (Milliman et al., 1993; Morse et al., 2003). The whitings form patches of milky waters that drift around for several days. Marine environments offer nutrient poor growth conditions for phototrophic organisms (lack of nitrate, phosphate...), and blooms appeared associated to upwelling events in which it is difficult to disentangle the various possible factors for calcite production. The origin of whitings in the Great Bahama Bank (GBB) has been hotly debated since many decades (Thompson, 2000; Broecker et al., 2001; Morse et al., 2003; Buros-Serrano, Marine Geology, 2009). Both biologically induced calcite precipitation phenomena (Robbins and Blackwelder, 1992; Robbins et al., 1997), as well as the idea that the GBB whitings may be caused by re-suspended sediments (Morse et al., 2003), have been proposed.

In fact the "biologically induced calcification process" (Thompson et al., 1997; Riding, 2006) illustrated two strongly associated phenomenon's: first, the generation of an alkaline microenvironment through the uptake of inorganic carbon (through the carbonic anhydrase (CA) activity on bicarbonate; second, the role of the complex layers formed by the structure of the cell walls. The photosynthetic activity by the cyanobacteria, using bicarbonate as carbon source increases OH⁻ expulsion and favours carbonate oversaturation, changing the chemical micro-environment of the water layers adjacent to the cell. HCO₃⁻ is transported

through the membrane and dissociated within the cell, in the carboxysome, into CO_2 and OH^- by the carbonic anhydrase. CO_2 is used in the Calvin cycle and the generated OH^- is excreted out of the cell through the cell membrane, where it reacts with HCO_3^- to form CO_3^{2-} (Miller and Colman, 1980; Thompson and Ferris, 1990; Kaplan et al., 1991; Merz, 1992; McConnaughey, 1994; Price et al., 1998; Kaplan and Reinhold, 1999; Badger and Price, 2003). The cytoplasmic membrane and the cell wall play probably an active role, increasing local cation concentrations (cation binding through molecules as polysaccharides) and acting as a diffusion barrier, slowing ion exchanges in this area (Schultze-Lam et al., 1992; Freydet and Verrecchia, 1998; Arp et al., 1999). According to these hypotheses, calcite nucleation takes place outside the cells close to the outer cytoplasmic membrane (in the S-layer). Nucleation contributes to lower the energy needed to make atom bonds in the solid form (Obst and Dittrich, 2005). Nevertheless demonstrations that cells or biological structures could play a role in the calcite precipitation by providing preferential nucleation sites are scarce. The macro-scale influence of cyanobacterial photosynthesis on pH inevitably complicates the laboratory demonstration of nucleation initiation. Indeed, in a carbonate system, it is impossible to vary a single component (of the CO_2 / HCO_3^- / CO_3^{2-} system), without modifying the two other component(s) or altering the pH. Thus, this strong interdependency in the carbonate system should be considered. Obst et al. (2009) applying an experimental approach, keeping stable the carbonate system over sufficient timescales to study induction of nucleation over fixed saturation state suggested a passive surface-induced mechanism for CaCO_3 nucleation by cyanobacteria.

In the present study, the CaCO_3 precipitation was examined in batch condition with bicarbonate as C source. Various initial bicarbonate concentrations were tested for a same calcium concentration and oppositely various calcium concentrations were tested with a same bicarbonate concentration. Some combinations of calcium and bicarbonate/carbonate have been done to mimic sea water composition (10.3mM for Ca and 1818 μM for HCO_3^-). We have tried to precise the precipitation conditions, and the influence of the growth kinetic on extent of respective precipitation events.

Material and methods

Cyanobacterial cultures and experimental setup

➤ *Cyanobacterial strain and culture conditions*

The marine strain of Cyanobacteria, *Synechococcus* sp. PCC 8806 was used. Cells were maintained on low (0.38 mM) CaCl₂ ASN-III growth medium (Rippka et al., 1979), with atmospheric CO₂ as carbon source. Every 4 weeks, 10 % (v/v) of the culture was transferred to fresh sterile medium.

Experiments were performed under sterile conditions in glass reactor (2.5 l) containing 1.5 l culture medium (171 mM NaCl, 17.65 mM NaNO₃, 0.30 mM MgSO₄·7H₂O, 0.18 mM K₂HPO₄, 0.03 mM FeCl₃·6H₂O, 1 ml Trace metal mix A5 + Co, and 20 µg vitamin B₁₂). Nitrate (as NaNO₃) was added in quantity enough to sustain biomass growth without limitation. The initial pH of the medium was adjusted to 8.0. NaHCO₃ and CaCl₂ were added as variables in the mineral medium. CaCl₂ was added during mineral medium preparation and NaHCO₃ just before inoculation (see below). The experiments were inoculated with the cyanobacterial cultures; the target cell number varying between 2.0×10⁷ and 1.3 ×10⁸ cells ml⁻¹. After inoculation, the reactors were immediately sealed with rubber septum and plastic screwed end-cap to avoid CO₂ exchange with the atmosphere. The reactors were incubated at a temperature of 25 °C, with a 12h/12h light/dark cycle and a 1.79 klux (35.8 µmol m⁻²s⁻¹) photon irradiance. Cultures were mixed with Teflon-coated magnetic stirring bars at 100 rpm in Incubator/Shaker (Snijders, ECD01E).

➤ *Experiments with different combinations of NaHCO₃ and CaCl₂*

The experiments were performed with different combinations of NaHCO₃ and CaCl₂ concentrations. Calcium and bicarbonate were introduced into the culture medium in variable amounts ranging from 0.34 mM up to 10.3mM for Ca and from 2.5 mM to 30mM for HCO₃⁻ (see table 1). The CO₂ present in the headspace, e.g. less than 10 µmol, is negligible compared to the introduced amount of HCO₃⁻, therefore the headspace was not purged. The oxygen in the headspace at the beginning of experiments was 21 % (v/v). The pH was not regulated. All the experiments were conducted in batch conditions.

Table 1: Assay conditions

Assays	[Ca ²⁺] mM	DIC mM	Inoculums charge cells ml ⁻¹
1	0.34	30	2.0E+07
2	3.4	30	2.0E+07
3	6.8	30	2.0E+07
4	10.3	30	2.0E+07
5	10.3	2.5	4.5E+07
6	10.3	5	4.5E+07
7	10.3	7.5	4.5E+07
8	10.3	10	4.5E+07
9	10.3	25	5.1E+07
10	10.3	25	5.1E+07
11	10.3	25	5.1E+07
12	10.3	25	5.1E+07
13	10.3	10	3.0E+07
14	10.3	20	3.0E+07
15	10.3	30	3.0E+07
16	10.3	7.5	1.3E+08
17*	10.3	7.5	1.3E+08

* Addition of CaCO₃ (1g l⁻¹) at start of the culture

Analyses

➤ **Biomass quantification**

The optical density was determined by a photo-spectrometer (Shimadzu, UV 1601) at 600 nm. A relation between C_{biomass} (μM) and absorbance at 600 nm (0 to 0.5) has been established (with R² > 0.98). A correlation was also established between dry biomass and cell density. C_{biomass} was determined by Rock Eval analysis. Good accordance was obtained between C_{biomass} determined with the Rock Eval 6 and elementary analysis (CONHS) on cyanobacterial biomass (Li et al., 2010a).

➤ **pH measurement**

The pH was continuously measured by a pH-metre, i.e. SevenMulti, METTLER TOLEDO equipped with software LabX direct pH (version 2.1) to record the data.

➤ ***Calcium quantification***

Calcium concentration (Ca^{2+}) was analyzed on culture medium samples filtered on a 0.2 μm cellulose acetate filter (Whatman). Filtrate samples were acidified (with 10 μl of a 2N HCl solution) and stored at + 4°C until analysis if not treated immediately. Calcium analysis was done by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a DIONEX ICS 3000 equipped with eluent generator and a self regenerating suppressor (CSRS-ULTRA 4 mm). Cations were separated at 30°C on a DIONEX IonPac CS12 column (4 mm x 250 mm) with methasulfonic acid 20 mM at a flow rate of 1 ml/min and quantified with a conductivity detector. The injection volume was 25 μl (full-loop injection). Linear calibration curves (with $R^2 > 0.999$) were obtained for calcium (0-400 μM). Detection limit was 5 μM .

➤ ***Bicarbonate, carbonate and OH⁻ quantification***

Bicarbonate, carbonate and OH^- ions were quantified by titration analysis with an automatic titrator (Titrimo 702 SM, METHROM). 10 ml filtrate was analyzed immediately after sampling. Sample was not diluted to avoid pH change and equilibration with atmosphere. Automatic titration was done with H_2SO_4 . Normality of H_2SO_4 was 0.01 N or 0.001 N depending on bicarbonate and carbonate concentrations in the sample. Calibrated increment volume of H_2SO_4 was 100 μl (corresponding to 1 μmol H^+ equivalent for 0.01 N). The data were recorded by software Tiamo (METHROM) and transferred into Excel under the form $\text{pH} = f(\mu\text{mol } \text{H}^+)$ to determined accurately the inflexion points corresponding to the transition carbonate/bicarbonate (referred as to the first inflexion point) and bicarbonate/ CO_2 (referred as to the second inflexion point). Respective bicarbonate and carbonate quantities are calculated from the cumulated quantities of H^+ (μmol) added to reach the two inflexion points. When OH^- ions are present (i.e. HCO_3^- absent) the amount of H^+ (μmol) added at the first inflexion point represents the sum of OH^- and CO_3^{2-} . Detection limits were 5 μmol for both CO_3^{2-} and HCO_3^- .

➤ ***Scanning electron microscopes***

Cyanobacterial cells and CaCO_3 were imaged with a Scanning Electron Microscopy (EVO MA10, ZEISS, Germany). 100 μl of sampling medium was deposited on a polycarbonate filter (0.2 μm) in close-contact with a filter paper saturated with deionised water (MilliQ) and placed in a desiccator with water recipient to maintain water saturation for 24 hours.

This procedure allowed maximal elimination of ions from the growth medium by diffusion into the filter paper. This procedure avoided ion crystallisation during the drying procedure and consequent interference on the electron microscopy imaging. The filter paper was then dried in a desiccator at room temperature for at least 48 hours. The dry samples were sputter coated with 10 nm gold/platinum before SEM imaging. The metalized sample was then observed with a conventional SEM mode. 5 kV of acceleration voltages was applied.

Results

General requirements

During cyanobacterial growth bicarbonate was rapidly metabolized. In the absence of calcium the carbon source is only distributed into an organic carbon (C_{biomass}) and an inorganic carbon ($C_{\text{CO}_3^{2-}}$) according to the proposed bicarbonate photosynthetic uptake mechanism (Merz, 1992; McConnaughey, 1994).

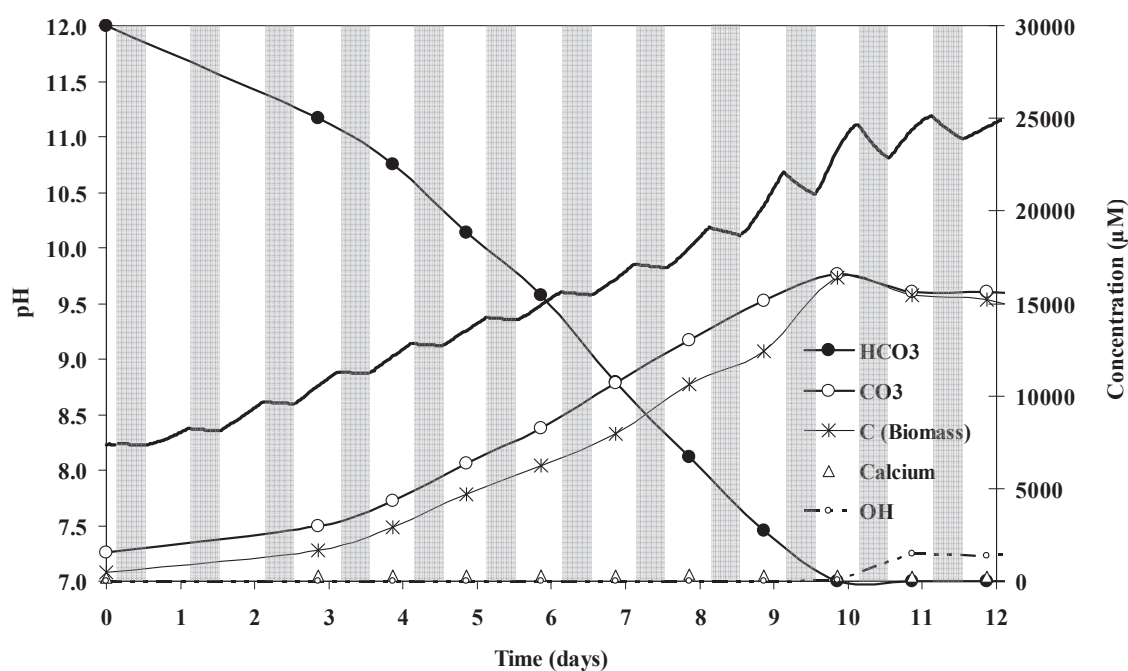


Figure 1: Cyanobacterial growth (assay 1 with 0.34mM Ca^{2+} and 30mM HCO_3^-) during 14 hours of light cycles (blank area) and 10 hours of dark cycles (gray area). Evolutions of pH (black line), HCO_3^- (filled circle), CO_3^{2-} (blank circle), C_{biomass} (star), Ca^{2+} (blank triangle) and OH^- (blank circle with broken line).

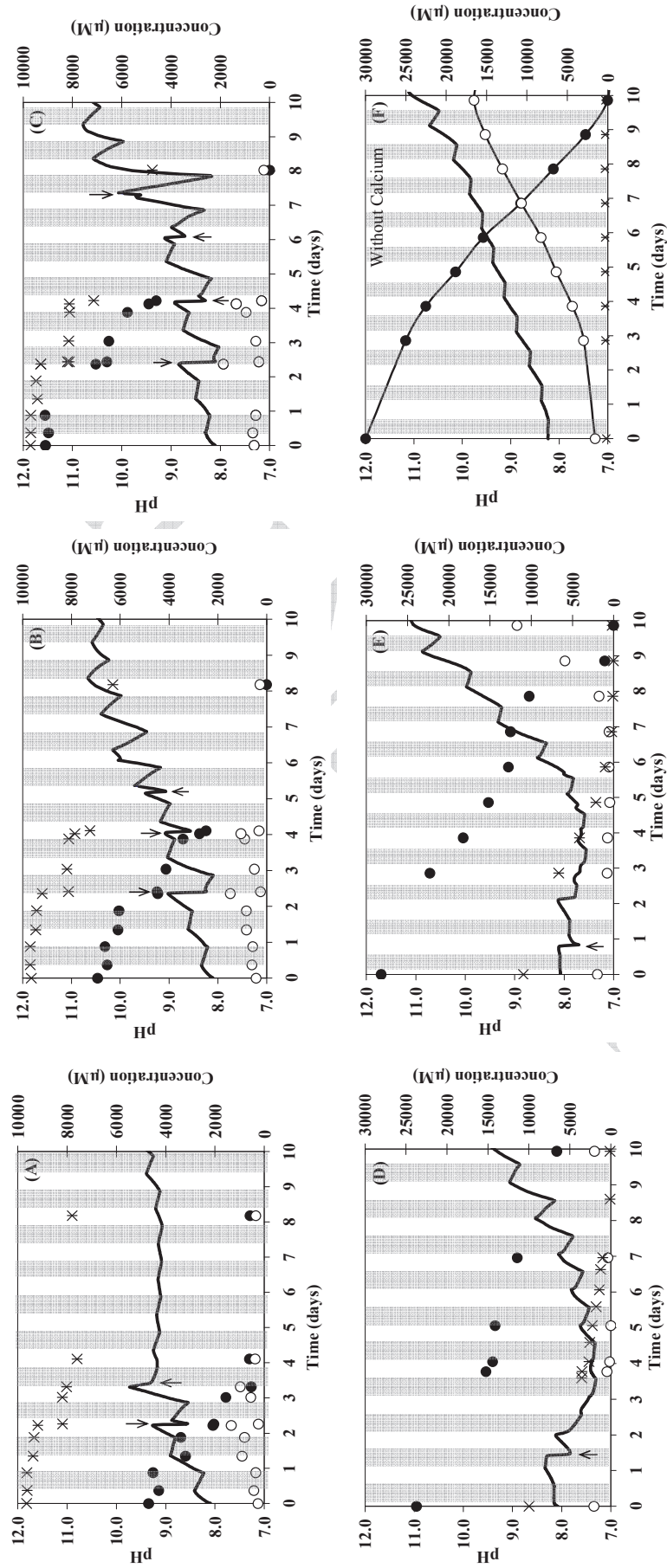


Figure 2: Cyanobacterial growth during light cycles (blank column) and night cycles (gray column). (A): assay 6 with 10.3mM Ca^{2+} and 5mM HCO_3^- (12 hours light cycle and 12 hours dark cycle); (B): assay 7 with 10.3mM Ca^{2+} and 7.5mM HCO_3^- (12 hours light cycle and 12 hours dark cycle); (C): assay 8 with 10.3mM Ca^{2+} and 10mM HCO_3^- (12 hours light cycle and 12 hours dark cycle); (D): assay 9 with 10.3mM Ca^{2+} and 25mM HCO_3^- (12 hours light cycle and 12 hours dark cycle); (E): assay 4 with 10.3mM Ca^{2+} and 30mM HCO_3^- (14 hours light cycle and 10 hours night cycle); (F): assay 1 with 0.34mM Ca^{2+} and 30mM HCO_3^- (14 hours light cycle and 10 hours dark cycle). Evolutions of pH (black line), HCO_3^- (filled circle), CO_3^{2-} (blank circle) and Ca^{2+} (star). Arrowheads indicate precipitation events.

The figure 1 and figure 2f presented an example of cyanobacterial growth on bicarbonate (30 mM) with a very low initial calcium concentration (i.e. 0.34 mM, assay 1), which illustrated the respective increase and decrease alternations of pH, corresponding to successive light (bicarbonate photosynthetic assimilation) and dark (dark respiration) phases. Nevertheless, the global pH increased during time course due to continuous change in the bicarbonate/carbonate ratio. A carbonate production of 14,987 μM was obtained for an initial bicarbonate concentration of 29,971 μM , reflecting an approximate 1:1 partitioning ratio between an organic carbon (C_{biomass}) and an inorganic carbon ($C_{\text{CO}_3^{2-}}$). Indeed the CO_2 released during dark respiration may be re-used through photosynthesis. No calcite precipitation was detected despite the increase of the carbonate concentration and the calcium concentration measured was stable all along the time course ($280 \pm 40 \mu\text{M}$).

CaCO₃ precipitations with various bicarbonate/calcium

➤ *Constant calcium concentration (10.3mM)*

The marine cyanobacterial strain *Synechococcus* sp. PCC 8806 was grown on bicarbonate, varying its concentrations from 2.5 to 30 mM and with 10.3 mM CaCl_2 (concentration of calcium in the sea water). The continuous carbonate concentration increase during the bicarbonate photosynthetic assimilation is conducive to calcite precipitation. The experiment conditions are presented in the table 1. The evolution of pH was monitored until bicarbonate was completely consumed. The bicarbonate, carbonate, calcium, hydroxyl were measured on the filtrated samples.

For the experiments conducted with 5, 7.5 and 10 mM bicarbonate (assays 6 to 8 inoculated with a similar cyanobacterial charge), pH drops were easily identified on the pH profiles. The number of pH drop events increased when increasing bicarbonate concentrations from 5 to 10 mM. The distinct pH drops are marked by arrows in the figures 2a, 2b and 2c. The first pH drops were observed after ~ 2.2 days, during the light cycle for one experiment and at the transition between light/dark cycles for the two others experiments. Their durations were approximately 1 hour. The second precipitation event occurred at ~ 4.1 days, only for the assays with 7.5 and 10 mM bicarbonate. The duration of this second pH drop was quite similar to the first one. These pH drops (acidification) reflected sudden eliminations of carbonate ions from the carbonate system.

Calcium and carbonate measurements at the beginning and at the end of the two first pH drop events confirmed that calcium and carbonate concentration decreases were strictly

time-correlated to pH drop. Moreover good correlations were obtained between calcium and carbonate concentration decreases (approximately 1 for 1). The first precipitation event occurred at ca. 1,400 μM carbonate and ca. 9,800 μM calcium concentrations (table 2). The extent of CaCO_3 precipitated was approximately 1,050 μM . The residual carbonate concentration after the first precipitation event was low (around 250/400 μM) but not equal to zero, despite a situation of calcium excess. The second precipitation event (only for assays with 7.5 and 10 mM bicarbonate) occurred at ~ 4.1 days at ca. 1,100 μM carbonate and ca. 8,000 μM calcium. The CaCO_3 precipitated extent was estimated to ca. 800 μM . The residual carbonate concentration after this second precipitation event was around 300 μM , close to the value obtained after the first pH drop event.

For these three experiments conducted with 5, 7.5 and 10 mM bicarbonate, the results accredit that the precipitation of calcium carbonate during the cyanobacterial growth proceeds roughly on a discontinuous manner. Such a drop of pH occurring during the photosynthetic phase means that, over this short period (< 1 hour), the carbonate elimination rate was greater than the production one according to photosynthetic activity.

Table 2: Precipitation events: calcium and carbonate concentration at the beginning and the end of the pH drop. Assays with 10.3mM calcium and variable HCO_3^- concentrations (5, 7.5 and 30mM).

Assay	$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{T0}}$	Precipitation event numbering	onset pH	Start of pH drop		End of pH drop		Ca^{2+} decrease μM	CO_3^{2-} decrease μM	
				$[\text{Ca}^{2+}]$ μM	$[\text{CO}_3^{2-}]$ μM	$[\text{Ca}^{2+}]$ μM	$[\text{CO}_3^{2-}]$ μM			
6	$\text{HCO}_3^- = 5$ mM	252	1	9.25	9 188	1336	8 184	233	1003	1103
7	$\text{HCO}_3^- = 7.5$ mM	428	1	9.02	9 196	1486	8 125	247	1071	1238
8	$\text{HCO}_3^- = 10$ mM	624	1	8.80	9 284	1873	8 174	437	1110	1436
13	$\text{HCO}_3^- = 10$ mM	452	1	8.66	10428	1359	nd	nd	nd	nd
6	$\text{HCO}_3^- = 5$ mM	252	2	9.72	8 023	970	nd	nd	nd	nd
7	$\text{HCO}_3^- = 7.5$ mM	428	2	9.08	7863	1052	7238	313	625	739
8	$\text{HCO}_3^- = 10$ mM	624	2	8.92	8 131	1351	7 139	325	992	1026
13	$\text{HCO}_3^- = 10$ mM	452	3	8.93	8881	1195	nd	nd	nd	nd

$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{T0}}$: Initial carbonate concentration

Others experiments have been operated always with the same calcium concentration (10.3 mM) but with higher bicarbonate concentrations, up to 30 mM.

The assays with 10, 20 and 30 mM bicarbonate (assays 13, 14 and 15) have been prepared with the same cyanobacterial charge. For these assays, the pH has been recorded during four days before inoculation. Despite the fact that the culture medium turned slightly

turbid, the pH did not change during this period and the respective bicarbonate and carbonate concentrations remained stable. It is evident that the carbonate quantity involved in the formation of CaCO_3 during this phase before inoculation is very low. According to the pH profiles, respectively 3 marked pH drops have been identified for these three assays (respectively 3, 3 and 2 pH drops, a third onset was not clearly obtained for 30 mM bicarbonate). Five occurred at the transition of light/dark cycles. In a general manner, considering the first drop for these three assays, it can be ruled that the higher the initial bicarbonate concentration the quicker the onset of the pH drop. Indeed for the experiments conducted with 10, 20 and 30 mM bicarbonate the first onset appeared at 3.5, 2.3 and 1.6 days; the second at 5.2, 4.8 and 2.7 days and the third at 7.2 and 5.7 days, respectively. This shortening time was clearly correlated with the initial carbonate concentration in the growth medium, according to the distribution of the two inorganic carbon species (bicarbonate and carbonate). For pH~8 the carbonate species represented about 6% of the total mineral carbon introduced.

For the assay with 30 mM bicarbonate (figure 2e), the theoretical carbonate quantity produced by photosynthetic bicarbonate assimilation was in large excess compared to the calcium quantity available, so the final time course pH profile for this assay is similar to the one with bicarbonate deprived calcium medium. A rapid alkalisation occurred due to bicarbonate disappearance and progressive carbonate concentration increase. Moreover, hydroxyl ions are observed when bicarbonate was completely assimilated.

For other experiments with 25 (assays 9 to 12) or 30 mM bicarbonate (assays 4 and 15) the pH profiles presented only a first marked pH drop. It appeared very quickly after 0.8 to 1.7 days probably in relation with a higher cyanobacterial inoculum charge. After the first precipitation event, during the following 3.5 days, the pH profiles presented a continuous decline (the second pH drop cannot anymore be considered as an isolate event, because it is followed by a marked continuous pH decrease during the night cycle). Furthermore, the alkalisation during the light period was almost completely masked and the pH remained stable at values ranging between 8.3 and 7.4. The pH profiles obtained for these cultures with high initial bicarbonate concentrations suggested that after the first pH drop, the calcite precipitation could occur continuously

For the assays with initial concentrations of 25 mM bicarbonate (assays 9 to 12), calcium, bicarbonate and carbonate concentrations were measured every 12 hours (at each light cycle transition), after the period of continuous pH decline mentioned above. In these

assays the calcium concentrations decreased continuously during the light period as well as during the dark period (figure 2d). Although pH profiles showed again increasing and decreasing alternation, the carbonate concentration remained very low (around 50/200 μM) during this period. These results reinforced the idea that for high photosynthetic activities and an initial 10.3 mM calcium concentration the precipitation phenomenon could become continuous.

For all the assays with varying initial bicarbonate concentrations (from 5 to 30 mM) and constant calcium concentration (10.3 mM), the table 3 assembled the calcium and carbonate concentrations at the beginning of each pH drop event. For each experiment the successive pH drop events have been numbered. It can be rule that the two first precipitation events are distinct precipitation events. Consequently the value of $\Omega = [\text{Ca}^{2+}] * [\text{CO}_3^{2-}] / K_{\text{sp}}$ has been calculated. K_{sp} has been taken as $4.3\text{E-}07 \text{ mol}^2(\text{kg sol})^{-2}$ for salinity $S = 35$ according to Mucci (1983). The ions activity coefficient was not taken into account for this estimation.

For the highest bicarbonate concentrations tested (20 to 30 mM), the drop events became less and less clearly marked. In these situations, where continuous precipitation was suspected, the Ω was probably not significant.

Scanning Electron Microscopy (SEM) imaging of culture samples have been made for three assays with 10.3 mM calcium and variable HCO_3^- concentration (5, 7.5 and 10 mM). For each sample, many fields of $0.84 \text{ mm} \times 1.139 \text{ mm}$ have been systematically observed. Images representative of each culture stage are presented in the figure 3. At early stage of the cyanobacterial growth (0.2 day), cells sticking together were observed (figure 3A). A few hours before the first pH drop and at the beginning of this pH drop, calcite in a scattered form (non-structured) and some in cubic form was found in close vicinity of the cells. The size of the crystal was around 1 to 5 μm (figure 3B and 3C). In the middle of the pH drop event (after 40 min), cubic form calcite was predominant. The size of the calcite agglomerates was greater than 20 μm . Traces of cells trapped in the agglomerate could be observed (figure 3D). At the end of the precipitation event (45 at 50 min), agglomerate size had grown (some are as big as 50 μm) and cubic as well as non-structured forms were easily observed. Traces of cells embedded in the agglomerates are also observed (figure 3E). At 4.1 days of culture, larger calcite crystals were characteristic of later stages of crystallization (between 50 to 100 μm) (figure 3F).

Table 3: Calcium and Carbonate concentrations at the beginning of different precipitation events. Assays with 10.3mM calcium and variable HCO_3^- concentrations (5-30mM).

Assay	HCO_3^-	Precipitation event numbering	$[\text{CO}_3^{2-}]_{T0}$	onset pH	Start of pH drop		Ω
					$[\text{Ca}^{2+}]$	$[\text{CO}_3^{2-}]$	
			μM		μM	μM	$\Omega = [\text{Ca}^{2+}] * [\text{CO}_3^{2-}] / \text{Ksp}$
6	$\text{HCO}_3^- = 5 \text{ mM}$	1	252	9.25	9 188	1336	29
7	$\text{HCO}_3^- = 7.5 \text{ mM}$	1	428	9.02	9 196	1486	32
8	$\text{HCO}_3^- = 10 \text{ mM}$	1	624	8.80	9 284	1873	41
13	$\text{HCO}_3^- = 10 \text{ mM}$	1	452	8.66	10 428	1359	33
	Mean value				9524	1513	34
6	$\text{HCO}_3^- = 5 \text{ mM}$	2	252	9.72	8 023	970	18
7	$\text{HCO}_3^- = 7.5 \text{ mM}$	2	428	9.08	7863	1052	19
8	$\text{HCO}_3^- = 10 \text{ mM}$	2	624	8.92	8 131	1351	26
	Mean value				8 006	1 124	21
13	$\text{HCO}_3^- = 10 \text{ mM}$	3	452	8.93	8 881	1195	25
9	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	4	2052	7.40	3 512	466	NS
10	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	4	2052	7.38	3 409	505	NS
11	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	4	2052	7.53	3 906	474	NS
12	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	4	2052	7.36	3 293	457	NS
14	$\text{HCO}_3^- = 20 \text{ mM}$	4	860	7.41	4 689	200	NS
	Mean value				3 762	420	
10	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	5	2052	7.57	2 291	442	NS
11	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	5	2052	7.68	2 167	424	NS
14	$\text{HCO}_3^- = 20 \text{ mM}$	5	807	7.34	3 392	207	NS
	Mean value				2 616	358	
9	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	7	2052	8.01	969	352	NS
10	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	7	2052	7.91	1 084	384	NS
11	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	7	2052	7.99	887	336	NS
12	$\text{HCO}_3^- = 25 \text{ mM}$	7	2052	7.99	861	372	NS
	Mean value				950	361	

$[\text{CO}_3^{2-}]_{T0}$: Initial carbonate concentration

Ksp: $4.3\text{E-}07 \text{ (mol}^2 \text{ (kg soln)}^{-2})$ for the sea water salinity

NS: No signification

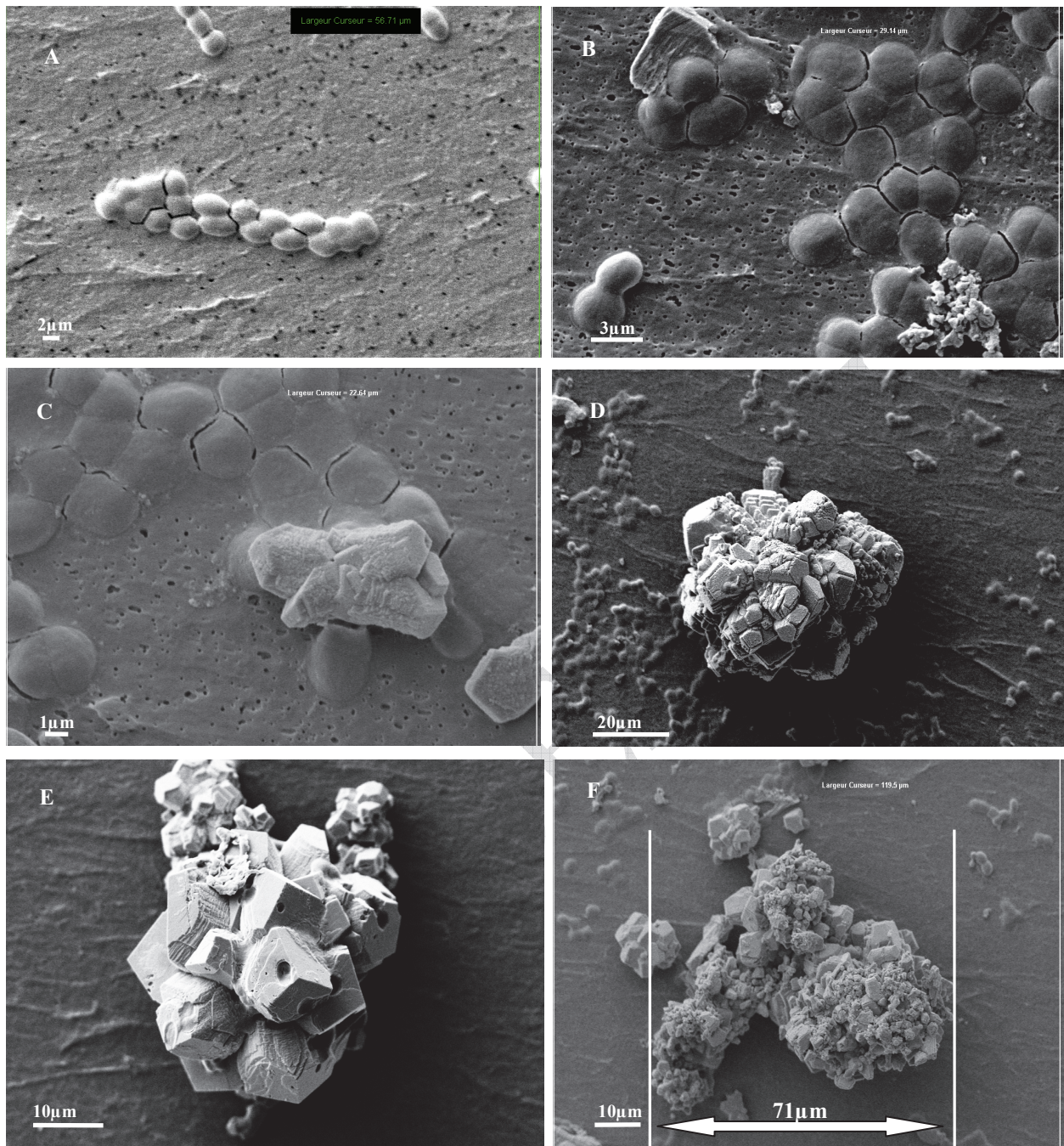


Figure 3: Scanning electron microscopy images at the different stages of crystal calcite formation. (A): at 0.2 days. (B) and (C): 2 hours before and at the beginning of the first pH drop (2.2 days). (D): during the pH drop (2.25 days). (E): at the end of the pH drop (2.26 days). (F): at a later stage (4.1 days).

➤ ***Varying calcium concentration (from 0.3 to 10.3mM)***

A series of assays with increasing initial CaCl_2 concentrations (ranging from 0.34 to 10.3 mM) has been performed while keeping the initial bicarbonate concentration constant at 30 mM. The different assays are presented in the table 1. The experiment performed with 0.34 mM calcium has been presented in the general requirement.

For the three other experiments conducted with 3.4, 6.8 and 10.3 mM initial calcium concentrations (assays 2 to 4), the first pH drop was clearly marked at 2.3, 1.5 and 0.8 days respectively.

For the assay with 3.4 mM calcium, only one pH drop occurred at the transition of the light/dark cycle. A pH increase was observed in the following photosynthesis cycle after the first pH drop. For the other two assays with 6.8 and 10 mM calcium, after the first precipitation event, the pH profile presented very weak or no increase during the four following photosynthesis cycles. Thus, continuous CaCO_3 precipitation after the first pH drop, as in situations discussed above (see assays 9 to 12, and assays 4 and 15) could be suspected.

Influence of calcite particles on CaCO_3 precipitation

Two experiments were performed to investigate the effects of CaCO_3 grain addition on the precipitation process. The initial concentrations of Ca^{2+} and HCO_3^- were respectively 10.3 mM and 7.5 mM. For one assay, 1 g l^{-1} of fine powdered (grain size ca. 2~40 μm) CaCO_3 was added into the medium at the start of the culture. Before inoculation, the pH did not change and the respective bicarbonate and carbonate concentrations remained stable during a period of 4 days. Then after, these two assays have been inoculated with the same cyanobacterial charge.

Four marked pH drop events e.g. calcite precipitation could be identified for each assay (figure 4). For the experiments without CaCO_3 addition, the first pH drop event was clearly marked at 0.3 day. This first pH drop appeared earlier than in the assay without initial calcite addition (0.8 days). For this experiment with calcite addition, when the first precipitation event occurred, the carbonate concentration was ca. 930 μM . This value is a little lower than the lowest value obtained for the same calcium concentration, ca. 1100 to 1400 μM .

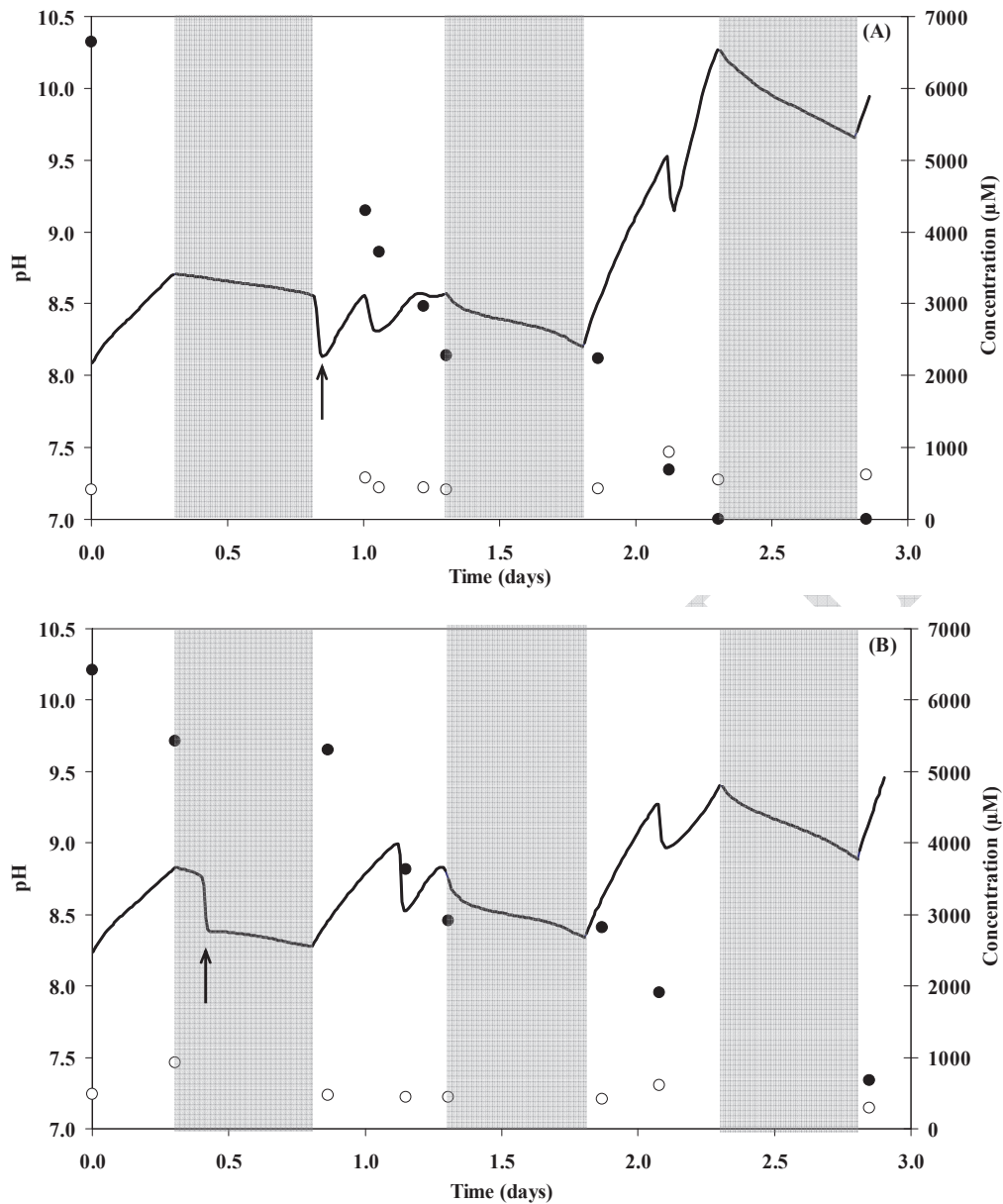


Figure 4: Cyanobacterial growth during light cycles (blank column) and dark cycles (gray column). (A): assay 16 (10.3mM Ca^{2+} ; 7.5mM HCO_3^- ; with 12 hours light cycle and 12 hours dark cycle) without CaCO_3 in the medium at the beginning of growth; (B): assay 17 (10.3mM Ca^{2+} ; 7.5mM HCO_3^- ; with 12 hours light cycle and 12 hours dark cycle) with CaCO_3 in the medium at the beginning of growth. Evolutions of pH (black line), HCO_3^- (filled circle) and CO_3^{2-} (blank circle). Arrowheads indicate the first precipitation events.

Conclusions

In order to determine the influence of the cyanobacterial photosynthesis processes on calcite precipitation, we grow the marine cyanobacterial strain *Synechococcus* sp. PCC 8806 on a bicarbonate medium, varying its concentration from 2.5 to 30 mM with 10.3 mM CaCl₂ (concentration of sea water). Control with a very low CaCl₂ content (0.34 mM) presented a typical progressive pH increase profile for cyanobacterial growth on batch condition which was due to the counterbalance between bicarbonate assimilated and carbonate produced. The alternation of light and dark cycles punctuated primarily the pH profile; the night period corresponding to the dark-respiration presented a systematic decrease of the pH related to the reaction between carbonate and CO₂ release from the cells, producing bicarbonate.

In experiments undertaken with calcium (>0.34mM), pH drops are systematically observed. These pH drop events are very short events (approximately one hour), clearly marked (pH decreases between 0.5 and 1 unit) and appeared during the light period. They can also appear at the end of the light period. Both calcium and carbonate decreases were strongly associated with the pH drop. Scanning electron microscope (SEM) images taken at different moments of the first pH drop event comforted the calcite precipitation with the pH drop. The precipitation was initiated in the cell vicinity as small grains (around 1 to 5 μm) and the major crystal growth was observed at the end of the pH drop. Moreover, slightly lower values for both calcium and carbonate concentrations have been measured for the second pH drop. This could perhaps accredit the role of cell structures or calcium carbonate grains as nucleation sites, favoring calcite crystallization according to the Ω calculated values. Experiments with higher initial bicarbonate concentrations contributed to higher carbonate productions and resulted in "continuous" calcite precipitation events succeeding to distinct precipitation events. Similar results could probably be obtained in the assay with high bicarbonate concentrations (30 mM) and a lower calcium concentration (6.8 mM). This "continuous" precipitation could be explained by both increases of biomass concentration and calcite precipitation contributing to favor the precipitation observed. This continuous precipitation mechanism occurred at neutral pH values, corresponding to very low carbonate concentration (around 50/200 μM), suggesting a possible limitation of CaCO₃ precipitation rate due to limited carbonate availability.

As cyanobacteria are ubiquitous and abundant in oceans and lakes, their influence on the calcite precipitation might present a significant impact on global carbon cycling. The

facilitated CaCO₃ precipitation due the presence of nucleation sites occur at lower Ω values and may contribute in natural environments to the carbon sink to the sediment. Moreover, the link of this precipitation mechanism with the cyanobacteria growth where the carbonate could be sequestered in an insoluble mineral form may be considered as a new future for reduction atmospheric CO₂ concentration and / or as an alternative path for capturing highly concentrated CO₂ gas fluxes.

The precipitation of CaCO₃ is mainly governed by the calcite saturation Ω , depending on the product of calcium and carbonate concentrations. Spontaneous nucleation need high oversaturation values ($\Omega = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]/K_{sp} > 100$, (with K_{sp} for 25°C), that are never encountered at large scales in natural environments (Dittrich and Obst, 2004).

In open environmental system as large lake or marine environments, the concentrations of carbonate and calcium in the bulk solution cannot be moved. Oppositely in batch condition, as in our experiments, photosynthetic assimilation of bicarbonate was responsible for increase of carbonate concentration in the bulk solution, contributing to favors oversaturation carbonate conditions. The pH drops are obtained with active photosynthetic activity (growth of the cells) and presence of calcium (from 3.4 to 10.3 mM) and accredited the rapid increase of the product $[\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]$. These results suggested that precipitation in our batch conditions is mainly governed by the concentration of carbonate and calcium in the bulk solution, according to the saturation curve for CaCO₃ precipitation. Nevertheless cell materials or cell membranes could play an active role for the furniture of nucleation sites as mentioned by Obst et al (2009). Scanning electron microscope (SEM) imaging of environmental samples often showed cyanobacterial cells embedded in calcite or calcite crystal surfaces showing cell marks. This SEM imaging sustains a nucleation on the EPS matrix (or S-layers), perhaps followed by growth phase of the calcite crystal outside the cell, perhaps on EPS matrix that shed from the cells.

References

- Arp, G., Reimer, A., Reitner, J., 1999. Calcification in cyanobacterial biofilms of alkaline salt lakes. *European Journal of Phycology* 34, 393-403.
- Badger, M.R., Price, G.D., 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* 54, 609-622.

Dittrich, M., Obst, M., 2004. Are Picoplankton Responsible for Calcite Precipitation in Lakes? *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 33, 559-564.

Freytet, P., Verrecchia, E.P., 1998. Freshwater organisms that build stromatolites: a synopsis of biocrystallization by prokaryotic and eukaryotic algae. *Sedimentology* 45, 535-563.

Kaplan, A., Reinhold, L., 1999. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 539-570.

Kaplan, A., Schwarz, R., Liemanhurwitz, J., Reinhold, L., 1991. Physiological and Molecular Aspects of the Inorganic Carbon-Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Plant Physiology* 97, 851-855.

Li, L., Haeseler, F., Dromart, G., Oger, P., Blanchet, D., 2010a. Conversion of hydrogencarbonate into biomass and calcium carbonate by the Cyanobacteria strain *Synechococcus sp.* PCC 8806. Submitted.

Li, L., Haeseler, F., Dromart, G., Oger, P., Blanchet, D., 2010b. Cyanobacteria culture in bicarbonate system to optimize biomineralization. Submitted.

McConnaughey, T.A., 1994. Calcification, photosynthesis and global carbon cycles. *Bulletin de l'Institut océanographique Monaco*, N° special 13.

Merz-Preiß, M., 2000. Calcification in cyanobacteria., in: Riding, R., Awramik, S. (Eds.), *Microbial sediments*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 50–56.

Merz, M., 1992. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* 26, 81-101.

Miller, A.G., Colman, B., 1980. Evidence for HCO₃⁻ Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. *Plant Physiology* 65, 397-402.

Milliman, J.D., Freile, D., Steinen, R.P., Wilber, R.J., 1993. Great Bahama Bank aragonitic muds; mostly inorganically precipitated, mostly exported. *Journal of Sedimentary Research* 63, 589-595.

Morse, J.W., Gledhill, D.K., Millero, F.J., 2003. CaCO₃ precipitation kinetics in waters from the great Bahama bank: Implications for the relationship between bank hydrochemistry and whittings. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2819-2826.

Mucci, A., 1983. The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure. *American Journal of Science* 283, 780-799.

Obst, M., Dittrich, M., 2005. Living under an atomic force microscope - An optimized approach for in vivo investigations on surface alterations towards biomineral nucleation on cyanobacterial cells. *Geobiology* 3, 179-193.

Obst, M., Wehrli, B., Dittrich, M., 2009. CaCO₃ nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for a passive, surface-induced mechanism. *Geobiology* 7, 324-347.

Price, D., G., Sultemeyer, D., Klughammer, B., Ludwig, M., Badger, R., M., 1998. The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Canadian journal of botany* 76, 973-1002.

Riding, R., 2006. Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic-Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology* 4, 299-316.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111, 1-61.

Robbins, L.L., Blackwelder, P.L., 1992. Biochemical and ultrastructural evidence for the origin of whittings: A biologically induced calcium carbonate precipitation mechanism. *Geology* 20, 464-468.

Robbins, L.L., Tao, Y., Evans, C.A., 1997. Temporal and spatial distribution of whittings on Great Bahama Bank and a new lime mud budget. *Geology* 25, 947-950.

Schultze-Lam, S., Harauz, G., Beveridge, T.J., 1992. Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *The Journal of Bacteriology* 174, 7971-7981.

Thompson, J.B., 2000. Microbial whittings, in: Riding, R., Awramik, S.M. (Eds.), *Microbial Sediments*. Springer, Verlag, Berlin, pp. 251-260.

Thompson, J.B., Ferris, F.G., 1990. Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water. *Geology* 18, 995-998.

Thompson, J.B., Schultze-Lam, S., Beveridge, T.J., Des Marais, D.J., 1997. Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography* 42, 133-141.

CONFIDENTIEL

4.3 Cyanobacteria culture in bicarbonate system to optimize biomineralization

Lun Li^{1,2}, Frank Haeseler¹, Philippe Oger^{3,4,5}, Gilles Dromart^{3,4,5} and Denis Blanchet^{1*}

¹IFP Energies Nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois Préau, 92852 Reuil Malmaison, France;
²Ecole Doctorale Matériaux de Lyon, France ³ Université de Lyon, France; ⁴ CNRS, UMR5570, Laboratoire de Sciences de la Terre, 15 parvis René Descartes BP 7000, Lyon, F-69 342, France; ⁵ ENS de Lyon, France;

Corresponding author, E-mail: denis.blanchet@ifpenergiesnouvelles.fr; Fax: +33 1 47 52 70 58; Tel: +33 1 47 52 66 89

Abstract

The well known calcifying potential of the cyanobacteria is questioned for capture and storage of CO₂ in the form of CaCO₃. However our understanding of the metabolism concerning favourable conditions for calcite precipitation, when growing under flue gas conditions, still may progress. Cyanobacteria are known to use bicarbonate and CO₂ as mineral carbon sources and a number of CO₂ and HCO₃⁻ transporters contribute to the accumulation of HCO₃⁻ into the cytosol. Nevertheless only CO₂ can serve as substrate for the Rubisco. CO₂ is obligatorily converted into HCO₃⁻ in the cyanobacterial cytosol using NADPH dehydrogenase complexes producing protons, which have consequence on the cell microenvironment, unfavourable to alkalinisation of the extracellular environment, oppositely to HCO₃⁻. Conversely, cyanobacterial growth on bicarbonate instead of CO₂ favoured CaCO₃ precipitation through alkalinisation of the extracellular environment. CO₂ assimilation by cyanobacteria through a carbonate system in which injected CO₂ is converted to HCO₃⁻ could be considered as an option of CO₂ capture solution with CaCO₃ precipitation. In this study, non limiting CO₂ supply condition was performed by CO₂ injection through a pH regulation system into the carbonate system. The expected bicarbonate and carbonate concentrations increase during the time course, due to nitrate consumption, was used to favour the condition

of CaCO_3 precipitation. Performances were precise with regard to photo-limitation phenomenon.

Introduction

Biom mineralization could be a potential for carbon capture and storage (CCS) to lower atmospheric concentrations of carbon dioxide (CO_2), particularly it could be applied to point-sources of flue gas emissions with elevated CO_2 levels, e.g. cement manufactures, refineries, coal fire power plants,... Biom mineralization through calcium carbonate (CaCO_3) precipitation is a natural phenomenon in marine, freshwater, and terrestrial ecosystems. This phenomenon has been described all over the past geological history (Altermann et al., 2006; Riding, 2006) and present days.

The calcification phenomenon has been extensively studied for calcifying microorganisms, and seems to be dependant on seawater composition in marine environment (Stanley, 2006; Stanley et al., 2005) as well as on the morphology and physiology of these calcifying microorganisms (Lowenstam and Weiner, 1989). In modern cyanobacteria calcification, Merz (1992) and Merz-Preiß and Riding (1999) suggested two calcification styles, i.e. impregnation and encrustation, responding to environmental factors, and also restricting calcification to certain taxa, cyanobacteria could be distinguished as "calcifying and no calcifying strains". According to Lee et al. (2006), species of cyanobacteria *Synechococcus* are known to be responsible for CaCO_3 precipitation in the presence of calcium via the carbonate formation in the culture medium due to an alkaline environment development during cell growth. Different mechanisms have been proposed and classified into biologically induced and biologically controlled. Moreover, the situation is probably more complex, Obst et al., (2009) suggested a passive surface-induced mechanism for CaCO_3 nucleation by cyanobacteria, the cells membrane contributed to reduce the specific interfacial free energy of the calcite nuclei.

The main accepted fact is that cyanobacterial calcification is clearly related to photosynthetic carbon uptake (Altermann et al., 2006; Riding, 2006). The inference of a relationship between CO_2 concentrating mechanisms (CCM)-stimulated photosynthesis and calcification has been rapidly suggested. In cyanobacteria, whatever the mineral carbon source entering the cell, only bicarbonate is present in the cytosol. The CO_2 entering the cell is converted to HCO_3^- by two known CO_2 uptake systems located in the thylakoid membrane (Price et al, 2008; Price et al., 1998). Moreover the carbonic anhydrase (CA) that operates the cleavage of the cytoplasmic bicarbonate into CO_2 is confined next to the Rubisco in the

carboxysome and has not been found in the cytosol (Kaplan and Reinhold, 1999). The proposed mechanism of inorganic carbon (Ci) photosynthetic assimilation gave prominence to the production of hydroxyl ions reacting outside the cell with bicarbonate in bicarbonate-rich environments to form carbonate ions in the vicinity of cyanobacteria cell membrane, inducing CaCO_3 precipitation in the presence of calcium (Miller and Colman, 1980; Thompson and Ferris, 1990; Merz, 1992; McConnaughey, 1994; Price et al., 1998; Kaplan and Reinhold, 1999; Badger and Price, 2003). In many natural aquatic environments, Ci and/or micro-nutrients availability and their supply rates are often severely limited. In these natural environments with CO_2 limitation ($<15 \mu\text{M CO}_2$), cyanobacteria can activate both CO_2 and HCO_3^- inducible transport systems in order to stimulate carboxysome Rubisco (Price et al., 2008). Despite of low Ci transfer into the cells, precipitation events could occur in freshwater areas, for example in the Everglades, Florida (Merz, 1992), in oligotrophic hard water as Lake Michigan (Dittrich and Obst, 2004), or Fayetteville Green Lake (FGL) (Brunskill et al., 1969; Thompson et al., 1997). Lacustrine calcite precipitation can result in sedimentation rates of up to 1 mm per year, nevertheless achieving large carbonate deposits over geological time (Teranes et al., 1999).

Considering biomineralisation as an alternative for geological CO_2 sequestration means enhancing both biomass productivity and precipitation efficiency. For this objective, a high Ci transfer rate into the cells is necessary. In this condition, the nature of the inorganic carbon source is probably critical for precipitation. Under high CO_2 supply, the H^+ generated during CO_2 uptake (conversion of CO_2 to HCO_3^- using 1 OH^- per CO_2 hydrated) could be neutralized by the OH^- produced by the conversion of HCO_3^- to CO_2 in the carboxysome (Price et al., 2008; Jansson and Northen, 2010). Under these conditions, the CO_2 fixation tends probably to be globally pH-neutral. Consequently, the high CO_2 transfer will tend to lower the pH at the cell-surface microenvironment generating unfavourable conditions to calcification. Moreover microalgae growth (*Chlorella* for example) inhibition has been reported with 10% and 15% CO_2 concentrations in the flue gas stream (Chiu et al., 2008). In these conditions with 2 to 15 % CO_2 (v/v) in gas flux, the average pH was 7.6 to 6.8. More surprisingly, weak Ci fixation into biomass (2% of the total CO_2 sequestered) by cyanobacteria *Aphanothece microscopica Nageli* using 15% CO_2 air has been reported (Jacob-Lopes et al., 2009), suggesting the existence of other routes of CO_2 conversion.

When HCO_3^- is the predominant carbon source, the conversion of HCO_3^- to CO_2 in the carboxysome will tend to generate an alkaline microenvironment at the vicinity of the cell membrane. In batch condition with calcium excess (greater than half of initial bicarbonate

concentration), approximately 50% of the carbon substrate is converted into CaCO_3 during cyanobacterial growth on bicarbonate. Moreover, the cyanobacterial carbon assimilations were quite similar, regardless the initial calcium concentrations in the batch cultures (Li et al., submitted).

Developments are needed to evaluate more precisely the potentiality of cyanobacteria to capture CO_2 (via photosynthesis and CaCO_3 precipitation) and to optimize the process with CO_2 rich flue gas as main carbon source. In this study, we cultivated *Synechococcus sp.* PCC 8806 in an open-system with atmospheric CO_2 as carbon source (limiting CO_2 supply condition as in major natural environments). Non-limiting CO_2 supply condition was also operated through a pH regulation, using the carbonate system (bicarbonate/carbonate) to capture CO_2 (0.003 v/v in air) injected. In these two approaches, very low calcium concentration was used to examine the photosynthetic response to the culture conditions with no CaCO_3 precipitation interference.

Material and methods

Cyanobacterial cultures

The marine strain of cyanobacteria *Synechococcus sp.* PCC 8806 was used for the present study and was maintained on ASN-III growth medium (Rippka et al., 1979) with atmospheric CO_2 as carbon source. The culture was transferred to fresh medium with low CaCl_2 concentration (0.38 mM) every 4 weeks. All cultures were grown at 25°C in an Incubator/Shaker (Snijders, ECD01E) under an intermittent light regime (12/12h light/dark cycle) with a photon irradiance of 1.79 Klux ($35.8\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

➤ *Cyanobacterial growth under strong CO_2 limiting supply*

The culture was operated in batch condition in clear glass serum bottles (2.5 l), filled with 1 l culture medium containing 171 mM NaCl, 17.65 mM NaNO_3 , 0.30 mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.125 mM CaCl_2 , 0.18 mM K_2HPO_4 , 0.03mM $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ml Trace metal mix A5 + Co (Trace metal mix A5 + Co (g l^{-1}): H_3BO_3 2.86, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.390, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.049), and 20 μg vitamin B_{12} . The initial DIC (carbonate plus bicarbonate) concentration was 0.38 mM. Culture pH was adjusted initially to 8.0. According to this pH value, bicarbonate is the main carbon species ($\approx 95\%$). The calcium concentration added into the mineral medium was very low (0.125 mM)

so preventing calcium carbonate precipitation during the Ci assimilation. CO₂ supply in the culture medium was achieved using atmosphere as inorganic carbon source (CO₂), under a gentle agitation with a Teflon-coated magnetic stirring bar (100 rpm). The liquid-column's height was 5.1 cm for 1L volume, and the liquid/gas interface's diameter was 12 cm.

The bottles were inoculated with cyanobacterial maintenance cultures to a target concentration of 1×10^7 cells ml⁻¹. Glass bottles were sealed with a plastic screwed cap equipped with holes for pH measurement, sampling and atmosphere exchange. Glass bottles were incubated in the same conditions as for maintenance cultures.

➤ ***Cyanobacterial growth with unlimited CO₂ supply***

The cultures were performed on the medium (11) used in the CO₂ limiting supply experiments, in a glass reactor (2.5 l). However, 2.1 mM inorganic carbon was added in the mineral medium in the form of sodium bicarbonate or sodium carbonate according to the regulation pH value. Culture pH was regulated by CO₂ injection in the culture medium (acidification of the culture medium). pH below the regulation value was not corrected.

The CO₂ was injected through a porous ceramic diffuser located at the centre of the reactor section upon the stirring magnet. The gas injected was an air mixture: 0.3% CO₂; 20% O₂ and 79.7% N₂ (Air Liquide®). The entrance pressure of the air/CO₂ mixture was 250 mbar. The pH was regulated using a multi-parameter transmitter M400 (METTLER TOLEDO). Two solenoid valves were positioned at the gas entrance and gas exit. The two valves were only opened for gas injection during pH regulation events (until pH value reached the target pH). CO₂ content from the exhaust gas was estimated by bubbling in a soda lime compartment. Nitrate was added to permit growth without limitation during a few cycles. The reactors were inoculated with cyanobacterial cultures to a target concentration of 1×10^7 cells ml⁻¹. They were incubated in the same conditions as for maintenance cultures for temperature, photon irradiance and intermittent light regime.

The cultures were grown at 25°C in an Incubator/Shaker (Snijders, ECD01E) under an intermittent light regime (12/12h light/dark cycle) with a photon irradiance of 1.79 Klux (35.8 μmol m⁻²s⁻¹).

Analyses

➤ ***Cell density determination***

The cell density was measured at 600 nm with a photospectrometer (Shimadzu, UV 1601). The cells were also counted with a *Malassez* haemocytometer under optic magnitude

($\times 1000$). A relation between C_{biomass} (μM) (determined by Rock Eval analysis) and absorbance at 600 nm (between 0 and 0.5) has been established, with $R^2 > 0.98$. The C_{biomass} content in the cell was in good accordance with the CONHS determination for cyanobacteria cells (Li et al., submitted).

➤ ***pH measurement***

The continuous pH measurement was achieved by a pH-metre, i.e. SevenMulti, METTLER TOLEDO with software LabX direct pH (version 2.1) to record the data.

➤ ***Anions determination***

Nitrate and nitrite were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The apparatus used was a DIONEX ICS 3000 equipped with an eluent generator and a self-regenerating suppressor (ASRS-ULTRA 4 mm for anion). The separation of the anions was done at 30 °C on an IonPac AS9-HC column (4 mm x 250 mm) with a gradient of KOH at 1 ml /min of flow rate. The injection volume of the sample was 25 μl (full-loop injection). Anions were detected with a conductivity detector. Software "Chromeleon" was utilised to pilot the DIONEX ICS 3000 equipment and to save the acquisitions data. Linear calibration curve (with $R^2 > 0.999$) was obtained for nitrate (0-2.5mM) and polynomial curve for nitrite (0-2.5mM) with $R^2 > 0.999$. Anions were analyzed in culture medium filtrate. The filtration was done with a 0.45 μm PTFE filter. Samples were stored at +4°C in closed sampling tubes until analyze.

Bicarbonate, carbonate and OH^- ions were quantified by titration analysis with an automatic titrator (Titrimo 702 SM, METHROM). 30 ml filtrate was analyzed right after, without sample dilution to avoid pH changes and equilibration with atmosphere during sample handling. Automatic titration was done with 100 μl calibrated increment volume of H_2SO_4 (corresponding to 1 μmol H^+ equivalent for 0.01N). Normality of H_2SO_4 was 0.01N or 0.001N depending on bicarbonate and carbonate concentrations. The data were recorded by software Tiamo (METHROM) and transferred into Excel to determine precisely on the pH/ H^+ (μmol) graph the inflexion points corresponding to transitions from hydroxyl and carbonate to bicarbonate (referred to the first inflexion point) and from bicarbonate to CO_2 (referred to the second inflexion point). Bicarbonate and carbonate are calculated from the respective quantities of H^+ added (μmol) to reach the inflexion points. When OH^- ions are present (i.e. HCO_3^- absent) the amount of H^+ (μmol) added at the first inflexion point represents the sum of OH^- and CO_3^{2-} . Detection limits were 5 μmol for CO_3^{2-} , HCO_3^- and OH^- .

➤ ***CO₂ determinations***

The CO₂ concentration in the headspace of the reactors was analyzed by a gas chromatography (GC). The equipment used was a gas chromatograph Varian 3800 equipped with a Porapak Q (80/100 mesh, Chrompack) column (2 mm ID, 2 m long). Helium was used as carrier gas at a flow rate of 30 ml/min. The operational temperatures were: 130, 130, and 100°C for injector, detector, and column respectively. The detection was done with a thermal conductivity detector. 250 µl of the headspace of the bottle was injected. The CO₂ response was calibrated with CO₂ (5%v/v ± 0.096) in N₂, certified by Air Liquide®.

Results

Evolution of bicarbonate, carbonate and hydroxyl ions during cyanobacterial growth under strong limited CO₂ supply

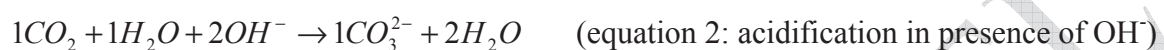
The values of pH, C_{biomass} production, bicarbonate, carbonate and hydroxyl ions concentrations measured during the cyanobacterial growth experiments under strong limited CO₂ supply are presented in the **Figure 1**. Bicarbonate, carbonate and C_{biomass} are expressed in µM of carbon. As suggested by the cross-cutting curves of **Figure 1**, the early growth phase was achieved consuming the initial bicarbonate stock (about 340 µmol). Utilization of HCO₃⁻ in photosynthesis releases CO₃²⁻ according to **equation 1**.



The pH increase (up to around 10) during the first six days reflects the permanent change between bicarbonate consumed and carbonate produced. At this stage the C_{biomass} production from the initial bicarbonate quantity provided could be approximately estimated to 170 µmol. After the complete removal of the initial bicarbonate, the biomass growth proceeded only on CO₂ transferred from the gas phase into the culture medium. The C_{biomass} increased linearly during the first 70 days to reach a concentration of 5600 µM, with a constant CO₂ assimilation rate estimated around 65 µmol C/day (expressed as C_{biomass}). The results reflect a biological growth on mineral carbon source limited by the CO₂ supply. Over this period the respective concentrations of OH⁻ and carbonate increased slightly around 350/500 µM respectively, the bicarbonate being always under the detection limit. The pH profile, fairly stable around 10, reflected a carbonate system in which the bicarbonate specie was close to nil.

After 70 days, an increase in the CO₂ supply was operated by reduction of the culture volume (from 1000 ml to 750 ml). The agitation in the reactor was not changed. The CO₂ assimilation rate increased from 65 to 160 µmol C_{biomass}/day. Changes in bicarbonate,

carbonate and hydroxyl concentration were observed simultaneously with both bicarbonate and carbonate increases and OH⁻ ions concentration decrease. These subsequent evolutions due to change in CO₂ supply conditions reflected the CO₂ speciation in the culture medium according to the two following equations (equations 1 and 2), and are associated with an acidification of the culture medium (pH 8.8). These evolutions suggested a short transient period (between 80 and 90 days) where the net CO₂ supply in the culture medium was greater than the photosynthetic bicarbonate assimilation potential.



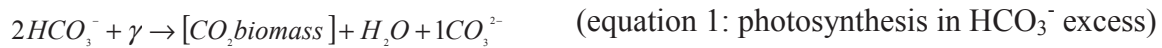
The biomass concentration increased rapidly due to the assimilation of bicarbonate resulting from CO₂ supply through the carbonate system (see **equations 2 and 3**). Then after, the instantaneous biological demand became again greater than the CO₂ supply. Again, the bicarbonate concentration decreased, and the carbonate concentration increased

A detailed observation of the pH evolution during the dark and light periods is presented in the **Figure 2**. During the dark phase, the photosynthesis ceased. The CO₂ entry in the carbonate system was responsible for the decrease of pH observed over the 12 hours of night period and was estimated by the evolution of hydroxyl, bicarbonate and carbonate concentrations (see **Table 1**) according to **equations 2 and 3**. CO₂ supply before and after 70 days have been respectively estimated to 42 and 90 μmol of CO₂ over a period of 12 h.

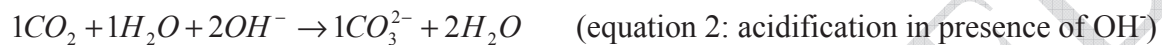
During the light period, the rapid increase of the pH value observed during the two first hours supported the assimilation of the night-rebuilt bicarbonate pool. For three photosynthesis cycles studied (non successive), the bicarbonate uptake has been estimated during these two first hours. The inorganic carbon consumption ways used during cyanobacterial photosynthesis (**equations 1 and 4**) depended on the initial bicarbonate concentration at the start of the light cycle. For low bicarbonate concentration (below 50/100 μM), the inorganic carbon uptake proceed mainly through **equation 4**, the reaction of OH⁻ with HCO₃⁻ becoming impossible. The two following equations (**1 and 4**) reflected photosynthesis in excess of HCO₃⁻ (equation 1) and in limitation of HCO₃⁻ (equation 4) (see **Table 2**). According to these successive mineral carbon assimilation equations, the variations of hydroxyl ions, bicarbonate and carbonate contents during these two hours are in good agreement with the two following equations (**1 and 4**):

The CO₂ supply during the first two hours of the light period were estimated at 7 and 15 μmol of CO₂, according to the CO₂ supply calculated over the night period for the two situations, respectively before and after 70 days.

- for bicarbonate consumption:



- for CO₂ supply, with the two following equations:



After the total bicarbonate consumption, the pH value was rather stable during the 10 following hours of the light period. A global suggested mechanism of Ci assimilation during this pH stable period (with bicarbonate concentration below detection limit) could be theoretically written as CO₂ reacting with OH⁻ and CO₃²⁻ (equations 2 and 3) to generate HCO₃⁻ which is immediately consumed according to the equation 4.

Cyanobacterial growth under unlimited CO₂ supply

In excess of bicarbonate in the bulk solution, the photosynthetic assimilation of bicarbonate conducted to a decrease of bicarbonate concentration and consequently to an increase of carbonate concentration according to the **equation 1**. The resulting alkalisation of the medium was counteracted through pH regulation via synthetic air injection into the photo-bioreactor, supplying CO₂ in the culture medium. This pH regulation generated the re-establishment of the initial ratio between bicarbonate and carbonate according to **equation 3**. The configuration of the line-gas with two solenoid valves maintained the gas phase upon the culture medium out of contact with atmosphere during all the time. The CO₂ potentially present in this gas phase after the air/CO₂ injection pulse could be trapped into the carbonate medium during the interval time between two valve stimulation events. A general scheme of gaseous CO₂ supply, reaction with the carbonate system, and bicarbonate assimilation with regulated pH is shown in the **Figure 3**. The biological mineral carbon demand continuously increased over time with biomass increase concentration in batch conditions.

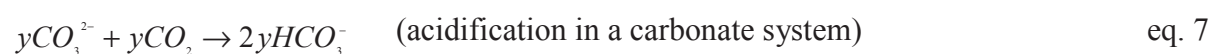
Cell density, nitrate, nitrite, carbonate, bicarbonate and gas phase composition were monitored during this experiment. The pH was continuously recorded.

The specific growth rate was studied at different pH, respectively 8.2, 9.0, 9.5, and 10.2 corresponding to $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ratios of respectively 85/15, 50/50, 15/85 and 0/100). Care was taken to prevent nitrogen limitation during growth rate measurements, and the mineral composition (micro-nutrients) was not limiting over the number of cell divisions considered. The specific growth rates were calculated only after the pH reached the target value. At the beginning of each light period, cyanobacterial growth proceeded without CO_2 injection until the pH reached the target value (the pH decreases during the night period due to dark respiration). The specific growth rate was determined on successive light periods using biomass data (absorbance at 600 nm). The estimated specific growth rate (0.04 h^{-1}) appeared to be maximal for 9.5 pH value. Nevertheless, for all the pH tested, the growth rates measured on successive light cycles decreased continuously and may be due to photo-limitation. The absorbance values ranged on the interval 0 to 0.8. Miller et al., 1984 suggested also a similar growth rate of 0.07 h^{-1} for the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* in HCO_3^- limited chemostat. This value was obtained in a carbon-sufficient chemostat culture at pH 9.5 with a [DIC] of $1700 \mu\text{M}$ in the culture reactor.

During time course, the concentrations of the two carbonate species (bicarbonate and carbonate) increased whatever the regulation pH values. This drift of the two species concentrations was due to the nitrate assimilation by cyanobacteria during growth. Brewer and Goldman's studies (1976; 1980) have demonstrated that uptake of one mole of nitrate (NO_3^-) by algae was responsible to alkalinity increase by one mole H^+ uptake or OH^- release. No change in alkalinity happens when urea is assimilated. According to this nitrate assimilation uptake, the drift of bicarbonate and carbonate concentration could be calculated. The nitrate consumption (expressed as x) contributed to alter the ratio r which depends of the pH regulation value (= bicarbonate/carbonate), according to:



The CO_2 injection (expressed as y) by pH regulation contributed to restore the r value for a given pH (see equation 3), increasing the respective bicarbonate and carbonate concentrations.



For the experiment at pH 9.5, bicarbonate and carbonate concentrations have been calculated during the photosynthesis period, according to the equation:

$$y = [C_1(r - 1) + C_2r + x] / [2 - r] \text{ with,} \quad \text{eq. 8}$$

- $x = \mu\text{mol nitrate consumed during time interval considered } (t_2 - t_1)$, known values
- $(\text{HCO}_3^-)_{t_1} = C_1$, data t_1
- $(\text{CO}_3^{2-})_{t_1} = C_2$, data t_1
- $r = 0.71 = \text{ratio } \frac{\text{bicarbonate}}{\text{bicarbonate} + \text{carbonate}}$ at pH 9.5, determined experimentally.
- $y = \text{unknown value, representing } \text{CO}_2 \text{ injected } (\mu\text{M}) \text{ to counterbalance the nitrate consumption.}$
- $(\text{HCO}_3^-)_{t_2} = C_1 + 2y - x$ and $(\text{CO}_3^{2-})_{t_2} = C_2 + x - y$.

The calculated bicarbonate and carbonate values, determined as mentioned above, were obtained for seven successive light periods taking into account the variation of nitrate concentration (x). During this period, the calculated values are in good agreement with the analyzed values (**Figure 4**). A good correlation between nitrate consumed and nitrogen incorporated in the biomass was obtained, with a cyanobacterial nitrogen content of 8.87% (w/w). This value has been determined on a cyanobacterial cells grown on bicarbonate without nitrate limitation. The nitrogen estimated in the biomass produced represented 113 % of the nitrate disappeared (**Figure 5**).

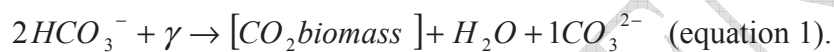
The pH decreased during the night period and the CO_2 injection was not stimulated (no regulation acting below pH target value). During this night period, nitrate was not consumed and biomass was not generated. The two solenoid valves were systematically closed during this night period and the gas phase of the photoreactor was not in contact with the atmosphere. CO_2 has never been detected in the gas phase at the end of the night period. CO_2 has also never been detected, immediately after air/ CO_2 mixture injection during the light period. Consequently the CO_2 excreted into the culture medium due to dark respiration was trapped by the carbonate system resulting in bicarbonate/carbonate ratio changes (acidification) according to the **equation 3**. The CO_2 produced during the dark respiration was estimated through the carbonate and bicarbonate concentration changes over the night period. The CO_2 values calculated on three successive night periods are respectively 250, 324 and 457 μM . During these three successive night periods the biomass concentrations measured

are respectively 68, 97 and 138 mg.l⁻¹. A net respiration was estimated to 3.4 μmol CO₂ .12 h⁻¹ per mg of biomass.

The carbon balance was also determined over a period of four days. Only 342 μmol (about 5.7 %) on a total of 6,062 μmol CO₂ injected has not been trapped by the carbonate system. The biomass carbon synthesized during this period was estimated to 6,209 μmol of C using absorbance data at 600 nm and 5,624 μmol of C using gravimetric method. These data well accredit the conversion of one mole CO₂ into one mole C_{Biomass} during growth on gaseous CO₂ as carbon source.

Conclusions-discussions

The carbon source availability is of central importance for aquatic photosynthesis. The mineral carbon source for photosynthesis can be either CO₂ or bicarbonate depending on environmental conditions (marine environments, hard-lake or freshwater streams...). In the case of bicarbonate, the global reaction can be formalized by the following equation:



In the present study, the first experimental approach was implemented with a limited mineral carbon source supply (atmospheric CO₂ diffusion into the liquid phase). During the cyanobacterial growth, variations presented in carbonate, bicarbonate and also in hydroxyl ions concentrations resulted from pervasive unbalances between CO₂ transport (across the air-culture medium surface) and the biological demand. The evolution of both carbonate species and hydroxyl ions contents due to CO₂ supply can be explained by the two proposed bicarbonate consumption situations, in excess of bicarbonate (equation 1) or with bicarbonate close to zero (equation 4). The increase of pH values during the first hours of the light cycle (after a dark period) reflects the rapid consumption of the renewed bicarbonate pool. In the ten following photosynthesis hours, with negligible bicarbonate concentration in the growth medium, assimilation of CO₂ operated. Such evolutions could be present in natural environments, as in mats in which permanent unbalances between supply and biological demand of CO₂ (with changes in water covered/non-covered periods) may result in drastic evolution of the interstitial water compositions (Krumbein et al., 1977; Merz, 1992; Merz-Preiß, 2000). For instance, in Fayetteville Green Lake (FGL) (Brunskill et al., 1969; Thompson et al., 1997), a DIC decrease in the surface water was directly related to a spring *Synechococcus* bloom, suggesting a limited C_i supply in the lake from weak atmospheric transfer. Despite of C_i consumption (bicarbonate) by the cyanobacteria, pH did not vary

significantly around 7.9, partly because of great lake volume and developed calcification trapping carbonate ions.

In the second experimental approach presented in this study, the CO₂ supply in a carbonate system was governed by the pH regulation at a target value. In this condition, the mineral carbon addition, via CO₂ injection, was steadily adjusted to the biological biomass demand (growth without C limitation). Using this carbonate system, the cyanobacterial growth was done exclusively on bicarbonate.

During the growth, the release of hydroxyl, as a result of the bicarbonate consumption, promoted CO₃²⁻ production according to the equation 1. The CO₂ injection in the culture medium counterbalanced the disequilibrium occurring between the two carbonate species. The nitrate consumption contributed also to additional OH⁻ production (one mole of nitrate consumed produced one mole of hydroxyl). Consequently, the bicarbonate/carbonate ratio is also affected. This nitrate consumption was responsible over time for a drift (increase) of the respective concentrations of the two species of the carbonate system. The nitrate disappearance was in consistency with the estimated amount of nitrogen in the synthesized biomass, taken into account the C/N ratio of the cyanobacterial biomass grown on bicarbonate without nitrate limitation. No nitrite was produced with the marine strain *Synechococcus* PCC 8806 when using nitrate as nitrogen source.

The cyanobacteria culture in a carbonate system which is able to convert incoming CO₂ from flue gas should be developed as a possible solution for the final objective of a biological CO₂ sequestration process in the form of CaCO₃. Elevated pH values are optimal conditions for both CO₂ capture by the carbonate system and high cyanobacteria growth rates. Moreover the drift in bicarbonate and carbonate concentrations potentially favours the CaCO₃ precipitation condition which is mainly dependent on the respective Ca²⁺ and CO₃²⁻ concentrations. Controlling the detailed precipitation mechanism (nucleation and growth of crystal) will be an important future goal to ultimately optimize the biomineralisation.

Acknowledgements

We would like to thank Nicole Tandeau de Marsac from Institut Pasteur, Paris for providing the pure cyanobacteria strain *Synechococcus* sp. PCC 8806. We would also like to thank Véronique Bardin for outstanding technical assistance in microbial cultures.

References

1. Altermann, W.; Kazmierczak, J.; Oren, A.; Wright, D. T., Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology* **2006**, *4*, (3), 147-166.
2. Badger, M. R.; Price, G. D., CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* **2003**, *54*, (383), 609-622.
3. Brewer, P. G.; Goldman, J. C., Alkalinity Changes Generated by Phytoplankton Growth. *Limnology and Oceanography* **1976**, *21*, (1), 108-117
4. Brewer, P. G.; Goldman, J. C., Effect of Nitrogen Source and Growth Rate on Phytoplankton-Mediated Changes in Alkalinity. *Limnology and Oceanography* **1980**, *25*, (2), 352-357
5. Brunskill, G. J., Fayetteville Green Lake, New York. II. Precipitation and Sedimentation of Calcite in a Meromictic Lake with Laminated Sediments. *Limnology and Oceanography* **1969**, *14*, (6), 830-847
6. Chiu, S.-Y.; Kao, C.-Y.; Chen, C.-H.; Kuan, T.-C.; Ong, S.-C.; Lin, C.-S., Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, (9), 3389-3396.
7. Dittrich, M.; Kurz, P.; Wehrli, B., The role of autotrophic picocyanobacteria in calcite precipitation in an oligotrophic lake. *Geomicrobiology Journal* **2004**, *21*, (1), 45-53.
8. Jacob-Lopes, E.; Scoparo, C. H. G.; Lacerda, L. M. C. F.; Franco, T. T., Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **2009**, *48*, (1), 306-310.
9. Jansson, C.; Northen, T., Calcifying cyanobacteria--the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, *21*, (3), 365-371.
10. Kaplan, A.; Reinhold, L., CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1999**, *50*, 539-570.
11. Krumbein, W. E.; Cohen, Y.; Shilo, M., Solar Lake (Sinai). 4. Stromatolitic Cyanobacterial Mats. *Limnology and Oceanography* **1977**, *22*, (4), 635-656
12. Lee, B. D.; Apel, W. A.; Walton, M. R., Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresource Technology* **2006**, *97*, (18), 2427-2434.

13. Li, L., Haeseler, F., Dromart, G., Oger, P., Blanchet, D., 2010. Conversion of hydrogencarbonate into biomass and calcium carbonate by the Cyanobacteria strain *Synechococcus* sp. PCC 8806. Submitted.
14. Lowenstam, H. A.; Weiner, S., *On biomineralization*. Oxford University Press, New York: 1989; p 336.
15. McConnaughey, T. A.; LaBaugh, J. W.; Rosenberry, D. O.; Striegl, R. G.; Reddy, M. M.; Schuster, P. F.; Carter, V., Carbon Budget for a Groundwater-Fed Lake: Calcification Supports Summer Photosynthesis. *Limnology and oceanography* **1994**, *39*, (6), 1319-1332.
16. Merz, M., The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* **1992**, *26*, (1), 81-101.
17. Merz-Preiß, M., Calcification in cyanobacteria. In *Microbial sediments.*, Riding, R.; Awramik, S., Eds. Springer: Berlin Heidelberg New York, 2000; pp 50–56.
18. Merz-Preiß, M.; Riding, R., Cyanobacterial tufa calcification in two freshwater streams: ambient environment, chemical thresholds and biological processes. *Sedimentary Geology* **1999**, *126*, (1-4), 103-124.
19. Miller, A. G.; Colman, B., Evidence for HCO₃⁻ Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **1980**, *65*, (2), 397-402.
20. Miller, A. G.; Turpin, D. H.; Canvin, D. T., Growth and Photosynthesis of the Cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* in HCO₃⁻-Limited Chemostats. *PLANT PHYSIOLOGY* **1984**, *75*, (4), 1064-1070.
21. Obst, M.; Wehrli, B.; Dittrich, M., CaCO₃ nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for a passive, surface-induced mechanism. *Geobiology* **2009**, *7*, (3), 324-347.
22. Price, D., G.; Sultemeyer, D.; Klughammer, B.; Ludwig, M.; Badger, R., M., The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Canadian journal of botany* **1998**, *76*, (6), 30.
23. Price, G. D.; Badger, M. R.; Woodger, F. J.; Long, B. M., Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany* **2008**, *59*, (7), 1441-1461.

24. Riding, R., Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic-Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology* **2006**, *4*, 299-316.
25. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **1979**, *111*, 1-61.
26. Stanley, S. M., Influence of seawater chemistry on biomineralization throughout phanerozoic time: Paleontological and experimental evidence. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2006**, *232*, (2-4), 214-236.
27. Stanley, S. M.; Ries, J. B.; Hardie, L. A., Seawater chemistry, coccolithophore population growth, and the origin of Cretaceous chalk. *Geology* **2005**, *33*, (7), 593-596.
28. Teranes, J. L.; McKenzie, J. A.; Lotter, A. F.; Sturm, M., Stable Isotope Response to Lake Eutrophication: Calibration of a High-Resolution Lacustrine Sequence from Baldeggersee, Switzerland. *Limnology and Oceanography* **1999**, *44*, (2), 320-333
29. Thompson, J. B.; Ferris, F. G., Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water. *Geology* **1990**, *18*, (10), 995-998.
30. Thompson, J. B.; Schultze-Lam, S.; Beveridge, T. J.; Des Marais, D. J., Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and oceanography* **1997**, *42*, (1), 133-141.

Table Captions

Table 1: Variations in OH^- , CO_3^{2-} and HCO_3^- during the 12h night period.

Table 2: Variations in OH^- , CO_3^{2-} and HCO_3^- during the first 2h of the light period.

CONFIDENTIAL

Figure Captions

Figure 1: Cyanobacterial growth upon strong limited CO₂ supply.

Figure 2: pH evolution during succession of light/dark cycles.

Figure 3: CO₂ supply and bicarbonate assimilation in carbonated system controlled by pH.

Figure 4: Evolution of bicarbonate and carbonate concentrations during time course of the cyanobacterial growth (estimated versus analysed).

Figure 5: Correlation between nitrate consumed and N incorporated in biomass. The duration of the two cultures (assays 1 and 2) corresponded to the overall nitrate consumption (respectively after 8 and 16 days).

CONFIDENTIAL

Table 1: Variations in OH^- , CO_3^{2-} and HCO_3^- during the 12h night period.

	Days	[OH] μM	[CO ₃] μM	[HCO ₃] μM	CO ₂ supply $\mu\text{M}/12\text{H}$
T0 Night cycle	61.2	37	194	0	
T12 Night cycle	61.8	0	189	38	
$\Delta[12\text{H night cycle}]$		-37	-6	38	
		-37 **	-5 **	47 **	42 *
T0 Night cycle	68.2	128	174	0	
T12 Night cycle	68.8	0	208	65	
$\Delta[12\text{H night cycle}]$		-128	34	65	
		-128 **	38 **	52 **	90 *

* CO₂ supply estimated from acidification equations 2 and 3

** $\Delta[\text{OH}], [\text{CO}_3], [\text{HCO}_3]$ calculated

CONFIDENTIAL

Table 2: Variations in OH^- , CO_3^{2-} and HCO_3^- during the first 2h of the light period.

	Days	[OH] μM	[CO ₃] μM	[HCO ₃] μM	$\Delta[\text{HCO}_3]$ $\mu\text{M}/2\text{H}$	CO ₂ supply $\mu\text{M}/2\text{H}$
T0 Photosynthesis	60.8	0	170	71		
T+2H Photosynthesis	60.9	59	175	0		
$\Delta[\text{T0} - \text{T2H photosynthesis}]$		59	5	-71		
		59 **	6 **	-71 **	26+59 (1)+(2)	7*
T0 Photosynthesis	61.8	0	189	38		
T+2H Photosynthesis	61.9	67	183	0		
$\Delta[\text{T0} - \text{T2H photosynthesis}]$		67	-5	-38		
		58 **	-10 **	-38 **	0+67(1)+(2)	10 *
T0 Photosynthesis	66.8	0	216	20		
T+2H Photosynthesis	66.9	113	186	0		
$\Delta[\text{T0} - \text{T2H photosynthesis}]$		113	-30	-20		
		50 **	-15 **	-20 **	0+50 (1)+(2)	15 *

* CO₂ supply estimated from respiration period.

** $\Delta[\text{OH}^-]$, $[\text{CO}_3^{2-}]$, $[\text{HCO}_3^-]$ calculated with CO₂ supply reacted only with carbonate (equation 3)

(1) use of bicarbonate with equation 1

(2) use of bicarbonate with equation 4

CONFIDENTIAL

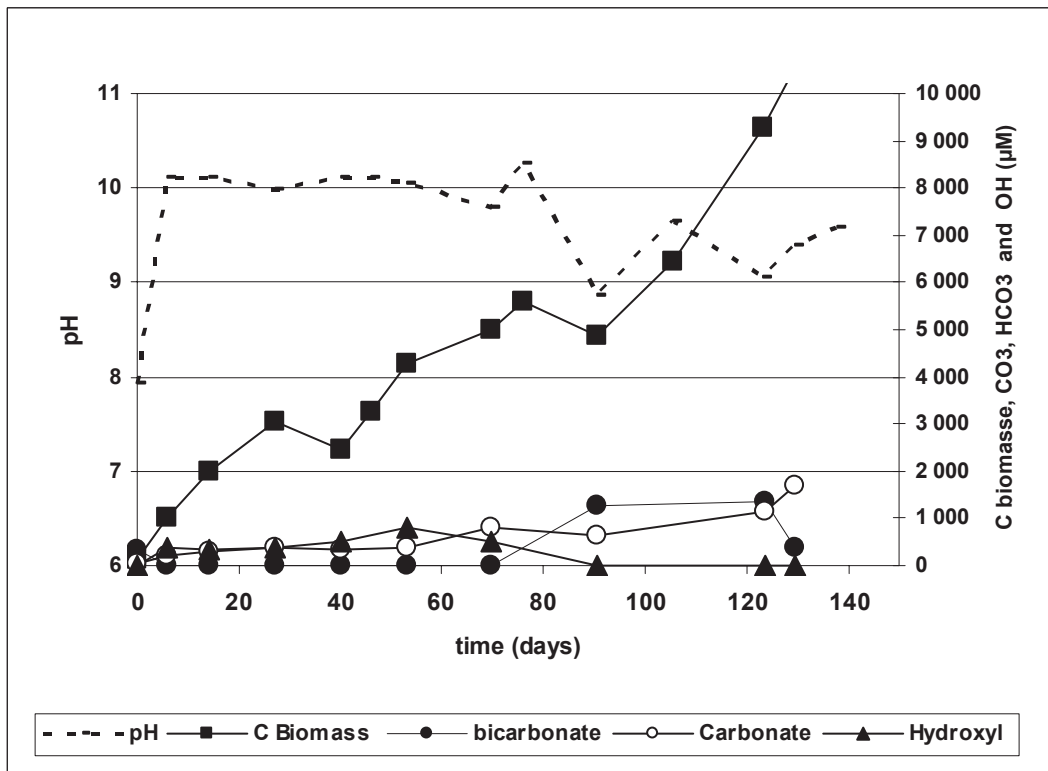


Figure 1: Cyanobacterial growth upon strong limited CO₂ supply.

CONFIDENTIAL

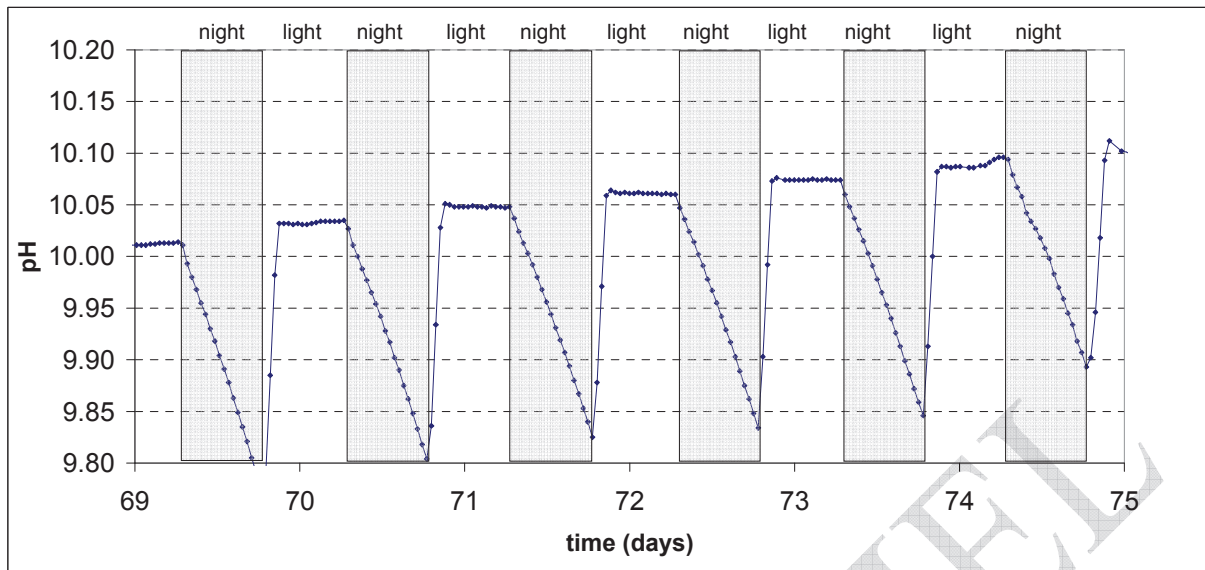


Figure 2: pH evolution during succession of light/dark cycles.

CONFIDENTIAL

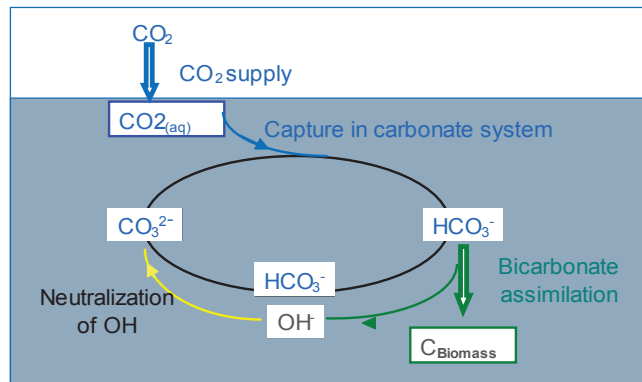


Figure 3: CO₂ supply and bicarbonate assimilation in carbonated system controlled by pH.

CONFIDENTIAL

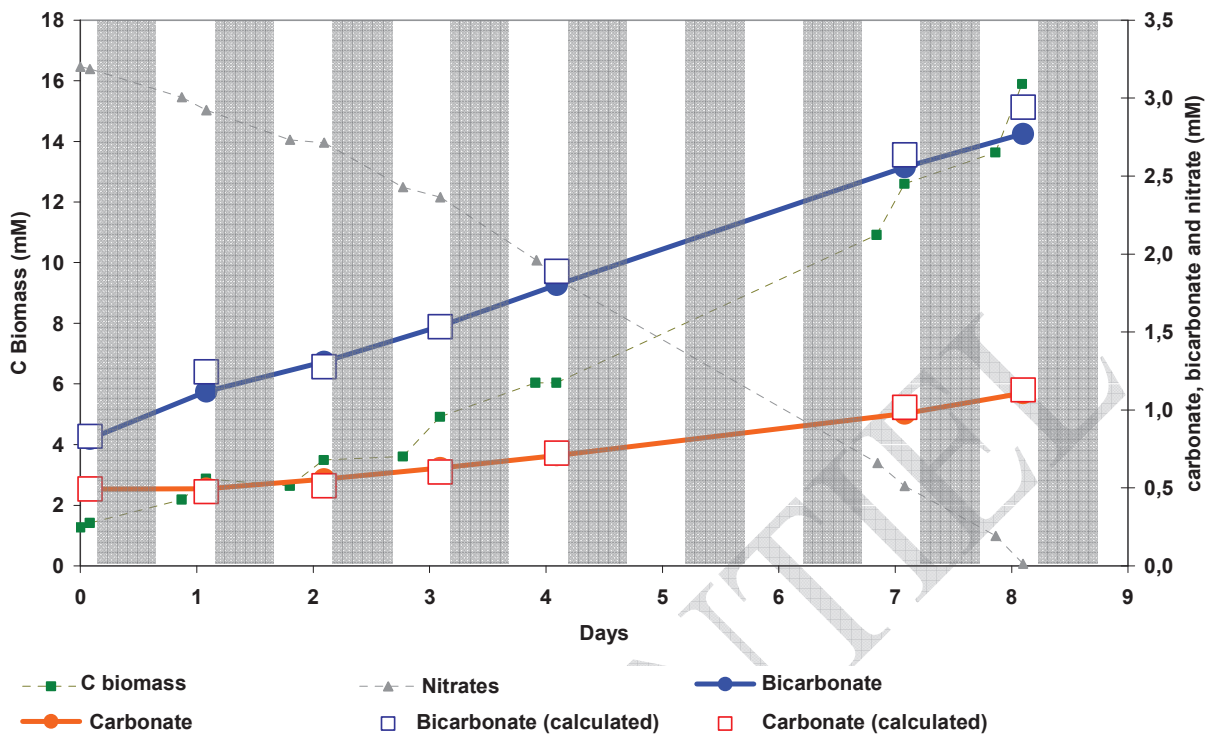


Figure 4: Evolution of bicarbonate and carbonate concentrations during time course of the cyanobacterial growth (estimated versus analysed).

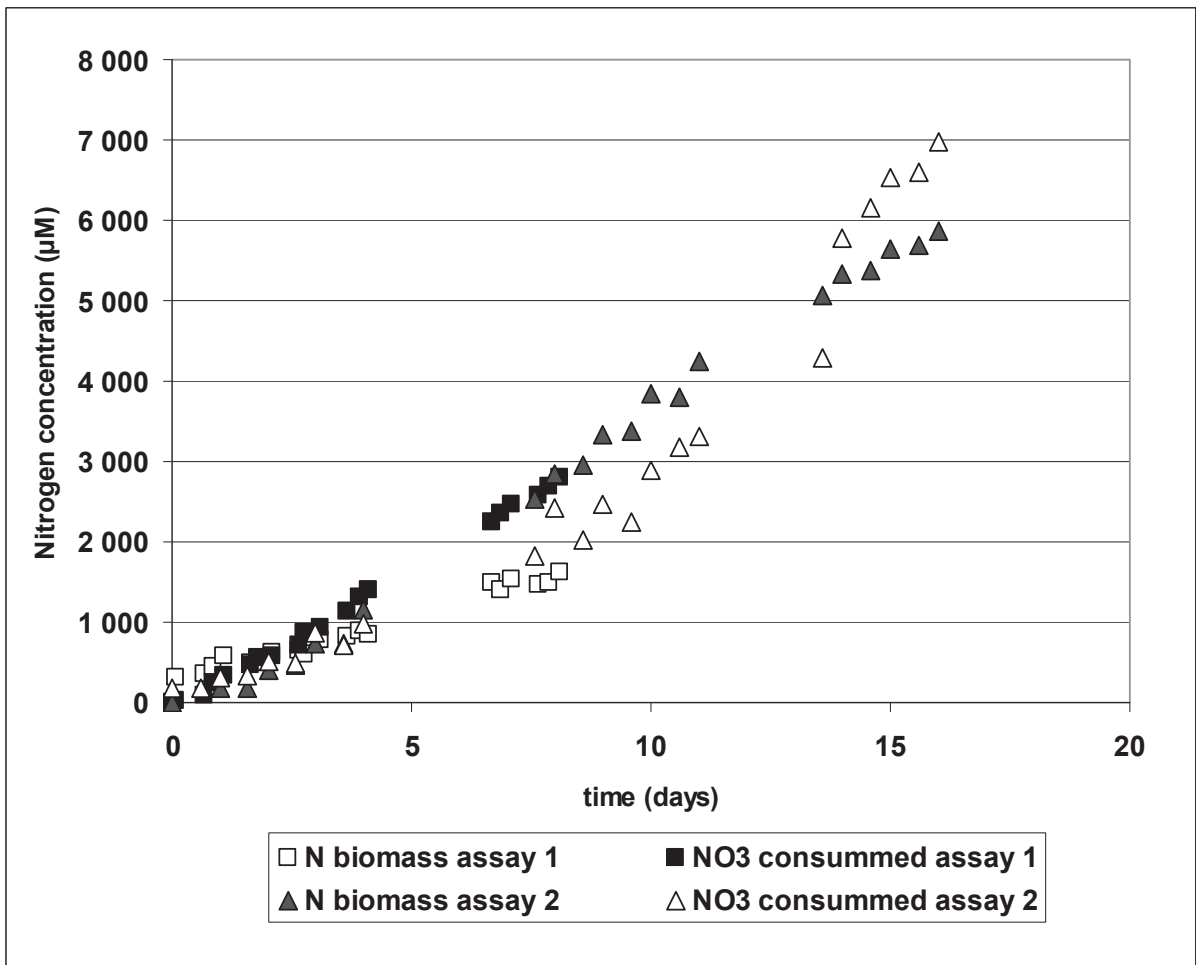


Figure 5: Correlation between nitrate consumed and N incorporated in biomass. The duration of the two cultures (assays 1 and 2) corresponded to the overall nitrate consumption (respectively after 8 and 16 days).

CONFIDENTIEL

5 Conclusions générale

Les risques de changement climatique liés au rejet de CO₂ dans l'atmosphère ont conduit le monde scientifique et politique à proposer un ensemble d'actions visant à réduire les émissions de CO₂ et à s'impliquer dans des programmes de recherche pour évaluer les effets de ce changement climatique au niveau des grands écosystèmes de la Terre. (GIEC, 2007¹).

La réduction des émissions de CO₂ passe par un ensemble d'actions comme la réduction des consommations dans le domaine du transport automobile mais aussi dans l'industrie, l'utilisation des ressources renouvelables issues de la photosynthèse, et le développement d'énergies nouvelles n'utilisant pas des ressources fossiles émettrices de CO₂, comme les énergies marines, éoliennes et photovoltaïques. Par ailleurs, des programmes à dimension internationale concernant la capture, le transport et le stockage géologique du CO₂ (CCS) sont actuellement en phase de recherche et de développement et IFP Energies nouvelles y participe activement. A coté de ce programme sur la capture et le stockage du CO₂, des programmes basés sur la valorisation énergétique de la biomasse sont également à l'étude et sont même parfois à l'étape de pilotes de démonstration. On citera l'utilisation des micro-algues, notamment de micro-algues lipidiques pour répondre aux besoins production de biocarburants.

Enfin depuis quelques années (voir le papier de 2010 de Christer Jansson et Trent Northen cité dans l'avant propos) une réflexion s'est faite autour de la **calcification biologique**. Les recherches actuelles se concentrent sur les microorganismes calcifiants, et notamment les **cyanobactéries**, car elles peuvent réaliser la **fixation du CO₂** atmosphérique sous forme de **carbonate de calcium** insoluble dans l'eau.

Parmi les travaux scientifiques se rapportant à l'évaluation des effets du réchauffement et qui s'adressent aux grands écosystèmes de la Terre, la relation climat-océans par le biais des échanges atmosphère/océans est extrêmement importante puisque l'assimilation du CO₂ par les océans régule l'accumulation de ce gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Ces échanges atmosphère/océans peuvent donc avoir une influence sur les changements climatiques.

Il apparait d'autre part que cette assimilation du CO₂ par les océans est à son tour affectée par les changements climatiques, au travers des processus physiques (par exemple la

¹ GIEC, 2007. Bilan 2007 des changements climatiques, p. 103.

température qui conditionne en effet la solubilité du CO₂ dans l'eau), mais aussi biogéochimiques au sein des Océans.

Parmi les processus biogéochimiques il faut mentionner la production primaire et, associé à cette production primaire, le puits de carbone que constitue l'exportation d'une partie de cette production vers les eaux profondes de l'océan. Parmi les acteurs de la production primaire il faut mentionner le rôle des cyanobactéries qui, à côté des coccolithophores, interviennent dans le cycle du carbone et du calcium. Ce sont ces cyanobactéries qui font l'objet de la réflexion autour de la calcification biologique proposée dans le cadre de cette thèse.

5.1 Cycle du carbone et climat

Les différentes questions relevant de la problématique du cycle du carbone au travers des équilibres atmosphère/océan et de l'acidification des océans ont été traités en détail dans l'introduction. On a abordé les conséquences possibles des changements physicochimiques de l'océan sur la production primaire (assimilation photosynthétique du bicarbonate en milieu marin) et sur le puits de carbone (sédimentation de carbonate de calcium en milieu marin).

L'océan représente l'acteur majeur pour la capture du CO₂. La réserve carbonatée, qui traduit la quantité de l'espèce carbonate susceptible de réagir avec le CO₂, est de l'ordre de 4,9×10³ Gt. L'équation de piégeage du CO₂ dans l'Océan est la suivante : $CO_2 + CO_3^{2-} + H_2O \rightarrow 2HCO_3^-$ et engage donc 1 carbonate pour 1 CO₂ piégé. La quantité de CO₂ dans l'atmosphère est aujourd'hui estimée à 0,66×10³ Gt, soit de l'ordre de 13 % de la réserve carbonatée des Océans.

Le piégeage par l'Océan du CO₂ atmosphérique se traduit par une acidification des eaux de surface correspondant à la bascule du système carbonate selon l'équation ci dessus, acidification qui, compte tenu des teneurs en CO₂ atmosphérique, va se poursuivre dans les prochaines décennies. La nature même du système carbonate (bicarbonate + carbonate) est tel que les évolutions de pH vont être de plus en plus marquées avec un processus d'acidification opérant dans cette zone de pH autour de 7,8/8,2, où la proportion de carbonate est faible par rapport à la proportion de bicarbonate (voir Figure 35). Du point de vue de l'évolution des paramètres physico-chimiques des eaux marines, l'augmentation projetée à l'échéance 2100 de la pCO₂ à environ 800ppmV devrait se traduire par un triplement de la concentration en CO₂ dissous dans l'eau par rapport aux valeurs de l'ère pré-industrielle. La concentration en carbonate diminuera de l'ordre de 50% et le pH de 0,4 unité.

D'un point de vue cinétique par contre, la vitesse de piégeage du CO₂ est liée à l'intensité des échanges entre l'atmosphère et l'océan par l'intermédiaire de la couche superficielle de l'océan (influence du vent, de l'agitation). L'augmentation actuelle de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère reflète grossièrement le déséquilibre entre les flux de rejets de CO₂ dans l'atmosphère provenant de l'utilisation des combustibles fossiles (8 Gt/an) et le flux de piégeage par l'océan. Ce flux de piégeage par l'océan est évalué actuellement à 2 Gt/an. Il faut le mettre en parallèle avec les flux importants et quasiment équilibrés, de l'ordre de 90 Gt/an de carbone, échangés par les deux principaux processus de **photosynthèse** et de **respiration**, vecteurs des échanges du carbone avec l'atmosphère. Les activités photosynthétique/et de respiration liées à cette production primaire impactent donc peu le cycle du carbone. Par ailleurs, ce cycle du carbone dans l'océan (turnover), associant la photosynthèse et la respiration, est très rapide. Le phytoplancton qui représente "le catalyseur" de cette activité est estimé à environ 1 à 2 GT C. Cela représente des turnovers de l'ordre de 1 semaine.

Dans l'évaluation des effets du changement climatique l'intérêt porté à la photosynthèse marine concerne principalement la production primaire, sa quantification et son évolution. Des cartographies couvrant l'ensemble de la planète sont établies de manière continue tout au long de l'année (Falkowski et al., 1998²). Cette interrogation sur la production primaire sous-tend la question de la modification possible de l'équilibre actuel du phytoplancton (acteur de cette production primaire) consécutif aux changements rapides de la chimie des océans. Cette évolution des caractéristiques chimiques des eaux de surface de l'océan interfèrera (comme elle l'a fait dans des périodes plus anciennes) sur l'équilibre des grands groupes du phytoplancton par le biais des caractéristiques physiologiques des différents groupes constitutifs, mais aussi par le biais de la dissolution des carbonates importés dans les eaux profondes des océans en raison de la modification des horizons calcites et aragonites dans les trois grands océans.

L'influence sur l'équilibre actuel du phytoplancton peut donc se répercuter sur des modifications de la production primaire globale, sur la répartition entre carbone organique et minéral et sur le puits de carbone essentiellement sous forme de carbonate de Ca/Mg déposé sur les planchers océaniques à moyenne profondeur (de l'ordre de 0,6 Gt/an).

² Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200-206.

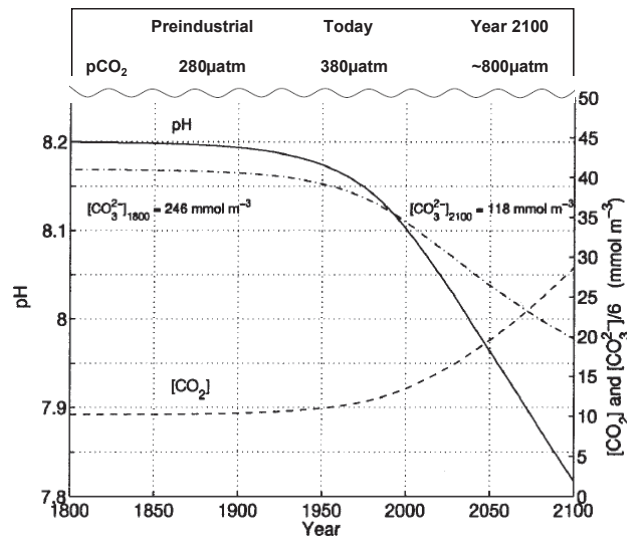


Figure 35: Évolutions du système carbonatate et du pH sur les base du scénario IS92a d'IPCC (Wolf-Gladrow et al., 1999³).

5.2 Organismes photosynthétiques et métabolisme du carbone et du calcium

Les questionnements concernant le métabolisme du carbone et du calcium, ainsi que les effets potentiels d'une augmentation du CO₂ atmosphérique sur la production primaire et ses acteurs, ont été abordés au travers d'un article comparant les cyanobactéries avec un autre grand groupe fonctionnel d'organismes photosynthétiques, celui des coccolithophores, tous deux impliqués dans les cycles du carbone et du calcium.

L'assimilation du carbone minéral par les organismes phytoplanctoniques photosynthétiques est basée sur la Rubisco, enzyme universel et premier enzyme de la photosynthèse marine et terrestre. Cet enzyme est apparu au cours de l'évolution de la vie à une période où la teneur en CO₂ dans l'atmosphère était importante. Ces organismes procaryotiques sont apparus très tôt dans l'histoire de la Terre (le plus vieux fossile de cyanobactérie connu a été trouvé en Australie, son âge est estimé à 3,5 milliards d'années). On attribue d'ailleurs le passage de 1 à 21 % de la teneur atmosphérique en oxygène (entre l'Archéen et le Protérozoïque) à l'activité photosynthétique des cyanobactéries. Les enregistrements sédimentaires semblent démontrer que la production de sédiments carbonatés

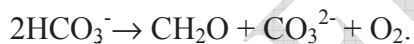
par les cyanobactéries est optimale pour des pCO_2 élevées. L'importance relative des cyanobactéries dans la production de carbonate a ensuite fortement diminué avec la baisse des teneurs en CO_2 de l'atmosphère terrestre. Ainsi, les stromatolithes ont presque disparu aujourd'hui alors qu'ils étaient omniprésents à l'Archéen alors que la pCO_2 était environ 100 fois supérieure à la pCO_2 actuelle. Avec l'évolution des teneurs respectives en CO_2 et en oxygène entre l'Archéen et le Protérozoïque, les organismes phytoplanctoniques et les micro-algues en général ont développés, du fait de la faible affinité pour le CO_2 de la Rubisco, des stratégies variables pour s'adapter aux diminutions des concentrations en CO_2 et aux augmentations des concentrations en oxygène. La chute de la concentration atmosphérique du CO_2 depuis des valeurs situées autour de 3000 ppmV durant le Trias jusqu'à des niveaux d'environ 500 ppmv pour le Jurassique coïncide par contre avec l'augmentation conjointe et régulière de la diversité et de l'abondance des coccolithophoridés dans les mers à partir de la limite Trias-Jurassique.

Pendant longtemps a prévalu l'hypothèse chez les micro-algues d'un métabolisme actif du calcium couplé avec une "calcification photosynthétique" pour les besoins de la génération de protons afin d'assister le microorganisme pour lui permettre l'entrée de nutriments et de bicarbonate selon l'équation : $Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow CaCO_3 + H^+$. On a ainsi tenté d'unifier dans une même approche le métabolisme d'entrée du calcium et la photosynthèse chez les algues unicellulaires. En effet le fait que la source de carbone minéral puisse être le CO_2 et le bicarbonate, avec une différence majeure qui réside dans la charge électrique, engendre des conséquences sur les stratégies développées pour contrôler l'homéostasie au sein de la cellule, mais qui interfère aussi sur le pH du microenvironnement extérieur de la cellule. Le bicarbonate était considéré comme une source de carbone inaccessible sans une source de protons : $H^+ + HCO_3^- \rightarrow CH_2O + O_2$. Les protons générés au cours de la calcification permettent la conversion de bicarbonate en CO_2 , lorsque ces protons sont excrétés dans le milieu environnant le microorganisme photosynthétique, stimulant ainsi la photosynthèse. Ainsi le message sur la calcification a été brouillé pendant longtemps par l'émergence de travaux intéressants impliquant des transporteurs trans-membranaires (Ca^{2+} ATPases) et concourant à l'échange entre le Ca^{2+} et des protons (H^+). Ceux-ci ont été largement étudiés,

³ Wolf-Gladrow, D.A., Riebesell, U., Burkhardt, S., Bijma, J., 1999. Direct effects of CO_2 concentration on growth and isotopic composition of marine plankton. *Tellus B* 51, 461-476.

notamment chez les plantes terrestres et les algues supérieures (McConnaughey, 1994⁴; McConnaughey and Whelan, 1997⁵). Les messages ont été brouillés aussi pour cette double source possible de carbone minéral (CO₂ et bicarbonate) pour les organismes photosynthétiques et la diversité des mécanismes de concentration du CO₂ à proximité de la Rubisco. La diversité des mécanismes dont se sont dotées au cours de l'évolution les micro-algues pour assimiler le carbone minéral, sous la forme soit de CO₂ soit d'hydrogénocarbonate, met en évidence le rôle important des enzymes du type anhydrase carbonique qui peuvent scinder l'hydrogénocarbonate en CO₂. Ces anhydrases carbonique (CA) peuvent être intra- ou extracellulaires et leur importance est considérable pour la souplesse d'utilisation de la source du carbone minéral. Cette diversité des mécanismes et notamment cette présence d'anhydrase carbonique intra- ou extra cellulaire viennent grandement compliquer les conclusions sur l'espèce minéral assimilée. Par ailleurs la mise en œuvre d'expériences dans un système carbonate n'est pas aussi simple qu'il y paraît, puisque ce système est contraint, la modification d'un paramètre interagissant inévitablement sur d'autres. Ceci n'a pas toujours été bien évalué par les expérimentateurs.

Le métabolisme des cyanobactéries en relation avec la précipitation de carbonate de calcium a été réexaminé dans les années 1990 et une écriture de la fixation photosynthétique du CO₂ à partir d'une solution de bicarbonate a été proposée:



L'ion hydroxyle provenant du clivage du bicarbonate par l'anhydrase carbonique dans le carboxysome, puis expulsé à l'extérieur du cytoplasme de la cellule au niveau d'un complexe réunissant la couche d'exopolysaccharides, la membrane externe et une couche de peptidoglycane, réagit avec un ion bicarbonate créant une sursaturation locale en ion carbonate ($\text{HCO}_3^- + \text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$). En présence de calcium la précipitation de carbonate de calcium est alors favorisée dans ce micro-environnement alcalin (à l'échelle de la centaine de nanomètre) créé par l'expulsion des ions hydroxyle.

Cette précipitation peut schématiquement se décrire comme une phase de nucléation favorisée par la sursaturation de carbonate suivie par une phase de croissance des cristaux de calcite. La nucléation demande de l'énergie. Ce niveau d'énergie peut être abaissé par le biais

⁴ McConnaughey, T.A., 1994. Calcification, photosynthesis and global carbon cycles. Bulletin de l'Institut océanographique Monaco, N° special 13.

⁵ McConnaughey, T.A., Whelan, J.F., 1997. Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. Earth-Science Reviews 42, 95-117.

de sites de nucléation apportés par cette structure complexe mentionnée ci-avant, réunissant les différentes membranes de la cyanobactérie et les exopolysaccharides. La croissance du cristal est ensuite un phénomène essentiellement chimique, faisant intervenir les notions telle que la saturation de la calcite Ω ($\Omega = [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{CO}_3^{2-}] / K_{sp}$ (avec K_{sp} le produit de solubilité). Les images de microscopie électronique mettent clairement en évidence que la précipitation est exo-cellulaire.

Chez les cyanobactéries il ne peut donc pas y avoir de précipitation de calcite sans croissance cellulaire. C'est donc l'activité photosynthétique sur l'ion bicarbonate qui est le véritable moteur pour la production extracellulaire de carbonate. La production de calcite est donc ensuite une simple affaire de chimie. L'équation globale théorique de croissance et de calcification en présence de calcium s'écrit ainsi : $2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{CaCO}_3 + \text{O}_2$ (**équation 1**). La transposition de cette équation aux diverses situations environnementales pour expliquer les whittings, les tapis bactériens et les potentialités de dépôts calcite n'a cependant pas été clairement établie malgré les études expérimentales menées au laboratoire ou les mesures sur site.

L'utilisation du carbone par les coccolithophores (qui sont des organismes eucaryotes) est également assez bien connue depuis les travaux de Paasche dans les années 1960. Les données les plus récentes portant notamment sur la physiologie des coccolithophores ont permis de proposer un modèle expliquant les blooms de coccolithophores. Dans le puits de carbone que constitue ces blooms de coccolithophores, la calcite est bio-synthétisée. La production de blooms de coccolithophores nécessiterait des conditions favorisant la croissance cellulaire (présence de micro et macronutriments). Cette forte croissance cellulaire entraîne tout logiquement une carence sévère de certains éléments comme le nitrate ou le phosphore de l'eau environnante, induisant un changement radical de métabolisme ayant pour conséquence de favoriser la production des coccolites (CaCO_3). Pour ces microorganismes, la synthèse de cette fraction carbonatée n'est donc pas assujettie à des règles de précipitation par sursaturation (en considérant les teneurs en calcium et en ions carbonate du milieu) comme pour les cyanobactéries. La production de coccolites n'est pas non plus liée à la production de biomasse par un ratio fixe, et il est d'ailleurs assez difficile de proposer un ratio $\text{Ci}/(\text{Ci}+\text{Corg})$ au sein d'un bloom de coccolithophores.

Cette synthèse illustre assez bien la nécessité d'une compréhension plus approfondie des métabolismes d'assimilation du carbone (minéral) et d'utilisation du calcium mais aussi

de la physiologie (régulation par des paramètres environnementaux) de ces deux grands types de microorganismes. Les connaissances acquises à ce jour permettent de proposer des hypothèses raisonnables sur les conséquences de l'évolution rapide de la chimie de l'eau, quant à la survie (régression ou expansion) de chacun de ces deux groupes fonctionnels, mais aussi quand à leur budget respectif $C_i/(C_i+C_{org})$. Nous sommes là dans un domaine de la biologie marine qui fait actuellement l'objet d'un intérêt grandissant en réponse au réchauffement climatique et aux changements spectaculaires et rapides de la chimie des océans.

5.3 Étude de la production de carbonate de calcium par les cyanobactéries

Les travaux de Merz (1992⁶), entre autres, avaient permis de proposer pour les cyanobactéries un rapport $C_{\text{biomasse}}/C_{\text{calcification}}$ autour de 1 à 1,2. Certains éléments des données de l'époque étaient cependant troublants et aucun travail n'était revenu sur cette question. Le carbone incorporé dans le carbonate de calcium n'était pas mesuré directement, mais estimé par le biais des changements d'alcalinité du milieu. Nous avons donc entrepris de développer une stratégie analytique qui manquait pour accéder aux bilans carbone et calcium d'une croissance de cyanobactérie sur bicarbonate. L'obtention de tels bilans est difficile compte tenu de l'impossibilité à séparer la fraction biomasse de la fraction carbonate de calcium. La littérature propose des attaques acides pour éliminer la biomasse et garder la fraction calcite. Néanmoins cette technique a été essentiellement appliquée aux coccolithophores et n'a d'ailleurs jamais été réellement utilisée à des fins de bilans précis.

Conversion of bicarbonate into biomass and calcium carbonate by the Cyanobacteria strain Synechococcus sp. PCC 8806

Dans une première partie du travail expérimental, nous avons mis au point et validé une approche analytique, mettant en œuvre la technique Rock-Eval, afin d'identifier et de quantifier sans interférence la biomasse et le carbonate de calcium. Cette technique analytique a été appliquée ensuite à une série d'essais mettant en œuvre des quantités connues de calcium et de bicarbonate, dans des rapports variables. On a ainsi quantifié avec précision la proportion relative entre la production de carbone organique (biomasse) et de carbone inorganique (CaCO_3) en fonction du calcium et du bicarbonate mis en jeu.

⁶ Merz, M., 1992. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* 26, 81-101.

En absence de calcium, nous avons confirmé l'équation d'assimilation de bicarbonate par les cyanobactéries : $2\text{HCO}_3^- \rightarrow 1\text{CH}_2\text{O} + 1\text{CO}_3^{2-} + \text{O}_2$ (avec donc une partition dans un rapport de 1:1 entre un C_{biomasse} et un $C_{\text{carbonate}}$). En présence de calcium nous avons obtenu des recouvrements Carbone et Calcium compris entre 90 et 100%. Quelque soit les rapports entre $C_{\text{bicarbonate}}$ et Ca au départ, nous avons montré que le $C_{\text{bicarbonate}}$ était incorporé dans la biomasse, systématiquement à hauteur de 50% de la quantité initiale, et donc indépendamment du calcium présent. Le complément carbone est retrouvé dans la somme du $C_{\text{carbonate}}$ libre et dans le C_{CaCO_3} . Le partage du carbone entre ces deux formes est principalement fonction des rapports de $C_{\text{bicarbonate}}$ et de calcium présents au départ des essais.

Dans les deux situations mises en œuvre, détaillées ci-dessous :

- une situation où la quantité de calcium est largement supérieure à la moitié de la quantité de bicarbonate, c'est à dire une condition d'excès de calcium/carbonate permettant d'engager sur une stricte base stœchiométrique la totalité du carbonate produit pour produire du carbonate de calcium,
- une situation où la quantité de calcium est largement inférieure à la moitié de la quantité de bicarbonate, c'est à dire une condition d'excès de carbonate/Ca permettant d'engager sur une stricte base de stœchiométrie la totalité du calcium dans carbonate de calcium,

la logique de répartition du carbone et du calcium n'est pas immédiate à l'examen des résultats. Les résultats obtenus font en effet apparaitre une production de carbonate de calcium de l'ordre de 50 à 70 % de la valeur théorique et posent la question du rendement de production de carbonate de calcium par rapport à la stœchiométrie de l'équation 1 ($2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{CaCO}_3 + \text{O}_2$)

En fait les conditions de survenue de la précipitation et la quantité de carbonate de calcium précipitée doivent être examinées en fonction des concentrations respectives des deux espèces, c'est à dire de la concentration de départ de calcium et de la concentration de carbonate, croissante avec l'avancement de l'assimilation du bicarbonate, et en faisant intervenir la notion de saturation de la calcite Ω ($\Omega = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]/K_{\text{sp}}$. C'est l'objet de la seconde partie du travail expérimental.

Calcite precipitation during growth of Synechococcus sp. strain PCC 8806

Une étude visant à élucider les mécanismes de la précipitation de calcite a été menée dans les mêmes conditions de culture, en variant les quantités de bicarbonate pour une

quantité fixe de calcium. La concentration de calcium a été choisie pour être comparable à celle de l'eau de mer (10,3 mM). Un contrôle mené en présence d'une concentration quasi nulle de calcium fait apparaître une succession de phases d'assimilation de bicarbonate par photosynthèse (pendant la phase éclairée) et de phases de respiration (pendant la phase non éclairée). Cette alternance métabolique (photosynthèse/respiration) est bien reflétée par l'évolution du profil de pH, avec une alcalinisation pendant la photosynthèse et une acidification pendant la respiration. Les cultures étant menées en fioles fermées, le CO₂ généré lors de la respiration est piégé par le système carbonate (et en conséquence pour les bilans, réutilisé ultérieurement sous la forme de bicarbonate). Quand ces essais sont réalisés en présence de calcium, on observe des précipitations de carbonate de calcium qui se manifestent sous la forme d'événements rapides, multiples et distincts. L'événement de précipitation se traduit par une chute brutale de pH qui traduit une élimination des ions carbonate du milieu aqueux. D'une manière générale, le nombre d'événements de précipitation augmente proportionnellement à la quantité de bicarbonate introduit (via la concentration). L'examen des événements de précipitation montre qu'à chaque événement distinct de précipitation la totalité du carbonate produit n'est pas utilisé, une concentration résiduelle est toujours mesurée. Les vitesses importantes de précipitation, traduites par la brièveté de la chute de pH, suggèrent que ces événements de précipitation ne peuvent être entretenus cinétiquement par la vitesse de consommation de l'ion bicarbonate (et donc de production de l'ion carbonate).

En présence de 10,3 mM de calcium, la succession d'événements de précipitation distincts s'explique par la nécessité de reconstituer une concentration en carbonate suffisante pour provoquer un nouvel événement de précipitation. Cependant, les concentrations en carbonate mesurées juste avant le début d'un événement de précipitation sont systématiquement plus faibles que celles mesurées pour l'événement précédent. Cette observation prévaut au moins pour les 3 premiers événements de précipitation. Ces faits semblent accréditer une "facilitation" de la précipitation avec l'avancement cinétique de l'essai, l'augmentation de biomasse pouvant jouer un rôle, mais aussi la charge en calcite (CaCO₃) présente dans le milieu. Cela étaye fortement les hypothèses proposées dans la littérature sur le processus de précipitation qui invoque le rôle joué par les sites de nucléation. On parle alors de précipitation bio-assistée.

En présence de quantités initiales plus importantes de bicarbonate (donc de concentrations), les événements ultérieurs de précipitation (énième précipitation) apparaissent

moins distinctement à l'examen du profil de pH. Des mesures systématiques aux alternances des cycles de jour et de nuit montrent toutefois une diminution systématique de la concentration en calcium. Pour ces précipitations le processus de précipitation intervient pour des concentrations faibles de calcium ($<4\text{mM}$) et quasi nulles de carbonate (200 à $400\ \mu\text{M}$) et à des valeurs de pH de l'ordre de 7 à $7,3$. Cette précipitation en présence de concentrations faibles en carbonate (et en calcium) suggère un processus dont la cinétique pourrait être limitée par les vitesses de production de carbonate.

Les images de microscopie électronique à balayage montrent l'évolution de la forme de la calcite à différents stades de la cinétique d'assimilation du bicarbonate, avec l'apparition de petits cristaux au départ du premier événement de précipitation, puis par la suite un grossissement rapide de ces cristaux avec des tailles de cristaux pouvant atteindre 25 à $75\ \mu\text{m}$. La taille de ces cristaux, bien plus grande que celle d'une cellule (de l'ordre du μm), conforte l'idée d'une croissance du cristal à l'extérieur de la cellule.

Ces deux premières parties du travail permettent de compléter les connaissances actuelles sur les conditions de précipitation de la calcite par les cyanobactéries en conditions de batch et de pouvoir prédire les rendements possibles de production de carbonate de calcium en fonction des concentrations respectives de calcium et de bicarbonate dans le milieu.

Cyanobacteria culture in bicarbonate system to optimize biomineralization

Une troisième partie expérimentale aborde la question de la source de carbone (CO_2 et bicarbonate) en vue d'une production optimisée de calcite. Quelque soit la source de carbone utilisée par les cyanobactéries, seul le bicarbonate entre dans le cytosol. Cette caractéristique est liée à la structure du CCM (CO_2 Concentrating Mechanism) développée par les cyanobactéries qui ne possèdent pas d'anhydrase carbonique dans le cytosol. La consommation d'un bicarbonate se traduit par la production d'un hydroxyle dans le cytosol, neutralisé par un ion H^+ , ou bien expulsé à l'extérieur de la cellule. L'utilisation de bicarbonate se traduit par une alcalinisation de l'environnement extérieur proche de la cellule, favorable à la production de carbonate par réaction de l'hydroxyle avec un ion bicarbonate présent dans le milieu. A l'inverse l'assimilation de CO_2 nécessite une hydrogénation au niveau de la membrane thylakoïde par une NADPH déshydrogénase. La production de H^+ consécutif à cette hydrogénation dans le cytosol peut servir à neutraliser dans le cytosol l'hydroxyle qui est

produit au niveau du carboxysome (ou l'un et l'autre peuvent être rejeté à l'extérieur). Ces conditions ne sont donc pas apparemment favorables à la création d'un environnement alcalin et donc à la sur-concentration des ions carbonate. Dans l'optique d'une production de calcite la culture de cyanobactéries sur bicarbonate est vraisemblablement plus propice.

Cette partie du travail a été l'occasion de réécrire les équations de transfert entre le CO₂ atmosphérique et un système carbonate, ainsi que les équations de photosynthèse en fonction des disponibilités de ces deux sources de carbone inorganique (CO₂ et bicarbonate). La culture des cyanobactéries en milieu ouvert, avec des faibles vitesses de transfert de CO₂ conduisent à des limitations de la disponibilité de la source de carbone. Ceci permet d'expliquer la présence d'ions hydroxyle.

On a pu mettre en évidence que la croissance des cyanobactéries dans un milieu minéral carbonaté dont le pH est régulé par l'injection de CO₂, s'effectue en fait en utilisant le bicarbonate comme source de carbone, celui-ci étant renouvelé dans le milieu par le CO₂ injecté. L'équation de l'addition de CO₂ dans le milieu carbonaté est la même que celle qui représente l'acidification de l'océan : $CO_2 + CO_3^{2-} + H_2O \rightarrow 2HCO_3^-$. L'équation globale de croissance sur le CO₂ (le CO₂ est la source de carbone au niveau du bilan global, mais du point de vue du métabolisme n'est pas le substrat des cyanobactéries) peut donc s'écrire $1CO_2 \approx 1C_{\text{Biomasse}}$.

Sur la base de la composition élémentaire de la biomasse [C₄H_{7.13}O_{2.04}N_{0.66}] (en négligeant le soufre), on peut écrire l'équation de photosynthèse qui prend en compte la consommation de dioxyde de carbone et d'eau, de nitrate, la production de biomasse et d'oxygène et l'alcalinisation du milieu :



Les ions hydroxyle réagiront différemment selon le milieu de culture. Dans une culture mise en œuvre dans un système carbonate, avec une injection de CO₂ pour réguler le pH, on observe une dérive des concentrations respectives des ions bicarbonate et carbonate en relation avec la production de biomasse. Cette dérive correspond à la consommation de la source d'azote, apportée sous la forme de nitrate. La consommation d'un ion nitrate produit en effet un ion hydroxyle (voir équation ci-dessus), qui réagit au sein du système carbonate avec un ion bicarbonate pour former un ion carbonate, nécessitant un rééquilibrage du pH, qui

est opéré par une addition complémentaire de CO₂. Cette consommation d'azote nécessaire à la synthèse de biomasse se traduit donc par un apport complémentaire de CO₂. Ce comportement du système carbonate à la consommation d'azote sous forme de nitrate dans les milieux marins au cours de la photosynthèse est connue sous le sigle "*nutrient-H⁺-compensation principle*" (Wolf-Gladrow et al., 2007⁷) et correspond à une compensation de la modification de l'électro-neutralité de la solution due à l'utilisation d'une espèce chargée (utilisée comme macronutriment), en l'occurrence des nitrates.

Les taux de croissance des cyanobactéries ont été examinés dans ces conditions de conduite de la culture, dans des milieux dépourvus de calcium. Les vitesses de croissance ont été mesurées pour des valeurs fixes de pH comprises entre 8 et 10.

Pour des valeurs faibles d'absorbance ($A_{600\text{ nm}}$), entre 0 et 0,8, les valeurs de vitesse de croissance mesurées au cours de trois à quatre cycles successifs de lumière (cycles pris en compte dès lors que les valeurs d'absorbance permettent une mesure suffisamment précise) diminuent systématiquement. Cette situation est reproduite pour l'ensemble des valeurs de pH testées. Les taux de doublement obtenus dans ces cycles successifs de photosynthèse sont supérieurs à 24 heures. Nb: les mesures sont faites sur des périodes inférieures à 12 heures.

Dans ces conditions, la croissance ne semble pas opérer à une valeur constante de μ , si faible soit elle.

Sur des périodes longues de culture, on observe une augmentation importante de la concentration en biomasse (qui peut être de l'ordre de 25 fois la concentration de départ). La consommation cumulée de CO₂ pendant cette période est très bien corrélée avec la production de biomasse cumulée (exprimée en C_{biomasse}). La consommation de CO₂ (exprimée par heure de photosynthèse et par litre de milieu) met en évidence une photo-limitation qui intervient très rapidement, dès 100 mg/L de biomasse. Pour des conditions expérimentales données (intensité d'éclairage et diamètre du réacteur) nous avons obtenu une valeur maximale de consommation de CO₂ de l'ordre de 200/225 $\mu\text{moles de } C_{\text{CO}_2}/\text{heure de photosynthèse et par litre de volume réactionnel}$ pour des concentrations de biomasse de 300 à 400 mg/L.

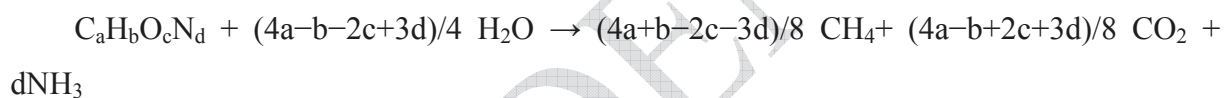
Pour évaluer une production de biomasse et de carbonate de calcium sur CO₂ comme source de carbone minéral il est nécessaire de développer des études complémentaires de

⁷ Wolf-Gladrow, D.A., Zeebe, R.E., Klaas, C., Körtzinger, A., Dickson, A.G., 2007. Total alkalinity: the explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Marine Chemistry* 106, 287-300.

culture de cyanobactéries dans un système carbonate régulé, et avec une fourniture de CO₂ en présence de calcium.

La biomasse des cyanobactéries peut faire l'objet d'une valorisation thermique (pyrolyse ou gazéification). Cependant, ces deux types de procédés nécessitent une biomasse déshydratée, ce qui est très coûteux du point de vue énergétique et rendra vraisemblablement la rentabilité économique et le bilan carbone du procédé inintéressants. Il apparaît donc intéressant de s'orienter vers un procédé couplant une production de calcite et une valorisation de la biomasse par un procédé de méthanisation présentant un double impact : économique et environnemental au travers de la production d'une énergie renouvelable et d'une séquestration de CO₂ sous forme de calcite (quand on ajoute un cation divalent au milieu de culture).

On peut calculer les volumes de méthane que l'on obtiendrait dans un procédé couplant la méthanogenèse à de la production de biomasse par culture de cyanobactéries. Pour une composition élémentaire de biomasse connue (C₄H_{7.13}O_{2.04}N_{0.66}), il est possible de prédire la production de CO₂ et de méthane dans un processus de méthanisation de la biomasse. On peut utiliser la formule suivante :



avec a = 4 ; H = 7,13 ; O = 2,04 et N = 0,66

qui ne tient pas compte des besoins pour l'énergie de maintenance et l'anabolisme. Dans ces conditions, 100 g de biomasse sèche donnent 2,13 mol de méthane et 1,86 mol de CO₂. Cela revient à produire 896 m³ de gaz pour une tonne de biomasse, dont 478 m³ de méthane et 417 m³ de CO₂. Cela fait une répartition de l'ordre de 53 et 47 % de la production de méthane et de CO₂. Soulignons les valeurs proposées par Hartman (1989)⁸ dans le cas des digesteurs anaérobies de station d'épuration (858 m³ de gaz par tonne de biomasse) avec une répartition en méthane de l'ordre de 70% et de 29 % de CO₂.

On ne tient pas compte non plus des rendements de digestibilité, qui sont fonction de la composition du complexe paroi/membrane, ni de la teneur en protéine du microorganisme, qui peuvent entraîner des inhibitions de la méthanogenèse par le biais des fortes concentrations d'ammonium libérés dans le milieu. Il est évident qu'un procédé industriel devra inclure également un système de recyclage du CO₂ présent dans le biogaz produit. Les estimations de production énergétique basées d'une part sur les données provenant de ce

⁸ Hartmann L, 1989, Biologische Abwasserreinigung, 2nd Edition, Springer Verlag.

travail de thèse et d'autre part sur des données industrielles de méthanisation sont simples à faire.

CONFIDENTIEL

6 Perspectives

Ce travail de thèse a été centré autour de l'assimilation du carbone inorganique par les cyanobactéries. Il a nécessité une parfaite maîtrise du système carbonate. En effet la compréhension du système carbonate, si elle est en définitive simple, une fois assimilée, est très riche en interactions croisées. Les différents paramètres intervenant dans le système carbonate sont les suivants (pH, titre alcalimétrique (ou TA), $[\text{CO}_2]$, $[\text{CO}_3^{2-}]$ et $[\text{HCO}_3^-]$). La connaissance de deux de ces paramètres donne accès à l'ensemble des autres. Les contraintes importantes que cela induit sur l'étude d'un système biologique au sein d'un système carbonate sont d'autant plus importantes que le système biologique lui-même va perturber l'équilibre initial. Cela a lieu par exemple de façon continue pendant la photosynthèse qui soutire une partie du carbone minéral pour former la biomasse ou de façon très brutale lors d'un évènement de précipitation de calcite qui bouscule totalement l'équilibre bicarbonate/carbonate en éliminant du carbonate. La formation de biomasse qui implique l'incorporation d'azote apporté sous la forme de nitrate va également se répercuter sur les concentrations respectives de bicarbonate et de carbonate.

Dans ces conditions la simulation de conditions rencontrées dans l'océan, où malgré l'activité de photosynthèse, à la fois le pH, et les concentrations "globales" en carbonate et en bicarbonate restent inchangés, est difficile à reproduire. Ceci n'a pas toujours été bien évalué par les expérimentateurs.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse répondent cependant à certaines questions. Par delà, elles offrent un certain nombre d'opportunités dans des domaines très variés :

- comprendre les mécanismes de survenue de la précipitation de CaCO_3 dans les phénomènes naturels :

- a. les "whitings" doivent être réexaminés à la lumière de ces résultats. En effet malgré la difficulté de simuler les conditions physicochimique prévalant dans les eaux ouvertes (marines en particulier), nous avons mis en évidence des possibilités de précipitations de carbonate de calcium à des pH de 7.3 à 8 pour des concentrations faibles en carbonate de l'ordre de 50 à 150 μM (les concentrations en carbonate de l'eau de mer étant de 272 μM).

- b. les tapis bactériens, qui par le biais des alternances de couverture et de retrait par les eaux peuvent être soumis à des variations de conditions environnementales importantes et brutales, notamment de la source de carbone, mais aussi des conditions d'oxygénation, d'oxydoréduction, de pH, etc.

- mieux comprendre la nature des carbonates générés par les précipitations biologiques et en estimer les volumes dans les séries sédimentaires. La forme des cristaux et leur taille jouent sans aucun doute un rôle important dans la structuration de la porosité, cet aspect devient un outil important pour comprendre les écoulements des fluides dans l'industrie pétrolière et l'hydrogéologie.

- réaliser un bilan de masse et une cinétique d'apparition de l'oxygène gazeux dans l'atmosphère au cours du protérozoïque. Cela pourrait se faire en quantifiant les structures carbonatées des stromatolithes et en déduisant la production d'oxygène et le piégeage de CO₂ que leur formation a induit dans l'atmosphère lors du démarrage de l'activité photosynthétique des cyanobactéries.

- établir un lien entre le climat, le système carbonaté dans l'eau (en particulier dans les océans) et la photosynthèse aquatique. Des relations entre le climat et l'érosion ont été décrits depuis longtemps. Il y a donc une relation entre le climat et la présence de certains minéraux dans les eaux. Ceci est de nature à influencer le type de producteurs primaires qui vont se développer dans l'eau et sur la productivité primaire. De fait cela va influencer le puits de CO₂ au travers de la formation de biomasse et de calcite tout en modifiant l'albédo au travers de la réflexion des rayons de lumière sur les particules planctoniques (en particulier durant les phénomènes de whitings". L'amélioration du savoir sur ces liens entre la photosynthèse et le climat permettra de mieux prédire les évolutions climatiques futures.

- développer un procédé industriel visant à produire :

- de la biomasse qui serait valorisée sous forme énergétique (par exemple de la biométhanisation) et qui constituerait donc une énergie tout à fait renouvelable et
- de la calcite. La capacité des cyanobactéries à induire une séquestration de carbone sous la forme de calcite pourrait constituer une véritable valeur

ajoutée à un tel procédé quand l'économie de l'émission de CO₂ se mettra en place. Ce dernier aspect est très important car nécessitant peu d'énergie en amont. En effet,

- l'optimum de croissance des cyanobactéries se situe à un pH de 9,5 et transforme donc le milieu de culture (système carbonate) en un véritable "solvant" de captage de CO₂ naturel et
- l'utilisation de fumées industrielles contenant 25 à 30 % de CO₂ serait tout à fait approprié pour alimenter des fermes d'aquaculture cyanobactériennes, rendant ainsi inutiles les procédés d'enrichissements en post- ou pré-combustion. Ceci constituera certainement un avantage financier et économique qui placera un tel procédé en bonne position par rapport aux approches de captage et stockage géologique.

Il apparaît donc clairement que les travaux réalisés au cours de cette thèse pourront avoir des retombées scientifiques, environnementales et économiques dans le domaine de l'énergie du futur et devraient apporter une contribution aux défis énergétiques du futur.

Le développement des systèmes industriels de culture d'algues unicellulaires et/ou de cyanobactéries pourraient permettre d'atteindre, dans le futur, des productivités importantes. Cela ouvrira certainement la porte à de nombreux autres débouchés au-delà de la valorisation énergétique. Ainsi la production à grande échelle d'une biomasse à faible coûts pourrait trouver des applications dans des domaines comme l'alimentation du bétail, la pharmacopée, la cosmétologie et peut être bien d'autres domaines auxquels on ne pense pas encore comme une future chimie verte / biotechnologie qui pourrait utiliser les capacités catalytiques extraordinaires des systèmes enzymatiques pour synthétiser des molécules et des produits à très forte valeur ajoutée, et aller ainsi vers une raffinerie verte.