

EFFET DES CHANGEMENTS CLIMATIQUES ET ATMOSPHERIQUES SUR LA
CROISSANCE ET LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE CHEZ *ANABAENA*
VARIABILIS : IMPORTANCE DES DISPONIBILITÉS DU MOLYBDÈNE ET DU
PHOSPHORE

par

Charline Bringuier

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Avril 2016

Le 25 avril 2016

*le jury a accepté le mémoire de Madame Charline Bringuier
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Robert L. Bradley
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Codirecteur de recherche
Département de chimie

Professeur Daniel Houle
Évaluateur externe
Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs

Professeur Bill Shipley
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

La fixation biologique d'azote réalisée par les cyanobactéries est un processus important dans les écosystèmes où la productivité est limitée par la disponibilité de l'azote. Dans des conditions de changements globaux, l'augmentation du CO₂ atmosphérique pourrait engendrer une augmentation des taux de fixation d'azote permettant de combler la demande croissante d'azote nécessaire à la croissance. Cependant cette augmentation des taux de fixation d'azote pourrait dépendre des disponibilités en molybdène (Mo) et en phosphore (P), mais également être contrebalancée par l'azote minéral apporté via les dépositions atmosphériques.

La complexité des systèmes naturels, notamment les caractéristiques de la symbiose cyanobactérie-végétaux supérieurs rends difficile l'étude de l'effet de l'augmentation du CO₂ et des dépositions atmosphérique sur la fixation d'azote, dépendamment des disponibilités en Mo et P. Nous avons donc tenté de déterminer les effets de ces facteurs environnementaux (CO₂ et apport d'azote minéral), en utilisant des cultures pures de cyanobactéries (*Anabaena variabilis*) dans différentes conditions de disponibilités en Mo et P. Cette approche expérimentale réductionniste nous a permis de mettre en évidence un effet significatif du P sur la concentration de la chlorophylle, indépendamment des conditions environnementales (CO₂, N) ainsi qu'une interaction entre le Mo et le P pour la variable chlorophylle, dans des conditions de CO₂ augmenté sans apport d'azote. Cette interaction entre le Mo et le P pourrait être expliquée par un compromis entre l'acquisition du carbone, facilitée dans des conditions de CO₂ augmentée, et la fixation biologique d'azote. Notre étude a également permis de mettre en évidence un effet significatif du P sur la croissance d'*A. variabilis*, dans des conditions de CO₂ ambiant et en présence d'azote. De façon plus spécifique, à haut P ($2.5 \cdot 10^{-5}$ M) le taux de croissance était plus faible ($P = 0.02$), alors que la quantité de chlorophylle et l'activité de la nitrogénase étaient toutes deux plus élevée ($P = 0.002$ et $P = 0.015$ respectivement). Cet effet du P pourrait être expliqué par une différence de stratégie de croissance de la cyanobactérie. A faible P, la cyanobactérie pourrait investir dans de courts filaments composés de cellules volumineuses, contrairement à des conditions de concentration en P élevées, où la

cyanobactérie pourrait investir plus dans la formation d'hétérocystes et de filaments plus longs, composés de cellules plus petites.

Cette étude apporte des pistes de réflexion quant aux stratégies permettant aux cyanobactéries filamenteuses de s'adapter à l'augmentation du CO₂ atmosphérique et des dépositions azotées, en fonction des disponibilités en Mo et P. Un compromis entre l'acquisition de C et la fixation d'azote ou un changement de la stratégie de croissance des filaments pourrait permettre aux cyanobactéries filamenteuses d'être moins sensibles aux stress environnementaux (augmentation du CO₂ atmosphérique et disponibilité des nutriments tels que l'azote).

Mots clés : Fixation biologique d'azote, CO₂ atmosphérique, dépositions atmosphériques d'azote, molybdène, phosphore, *Anabaena variabilis*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur, le Dr. Robert Bradley pour m'avoir offert cette opportunité de maîtrise dans son laboratoire ainsi que pour les conseils et la confiance qu'il m'a accordé au cours de ces deux dernières années. Je remercie également mon co-directeur le Dr. Jean-Philippe Bellenger, pour son accueil dans le laboratoire de chimie, pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de ce projet.

Je tiens également à remercier mes membres de comités, les Drs. Bill Shipley et Daniel Houle, pour leurs commentaires à différents stades de mon projet de recherche, ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour avoir financé cette maîtrise.

Un grand merci également au Dr. William F.J. Parsons, pour ces nombreuses discussions passionnantes et enrichissantes, ainsi qu'à tous mes compagnons de laboratoires autant en écologie qu'en chimie, notamment Jefferson Degboe, Martine Fugère, Alexandra Blais, Marion Belka, Christelle Jouogo-Noumsi, Nina Pourhassan et Romain Darnajoux, pour leur support, leur aide précieuse et les nombreuses discussions pas toujours très scientifiques.

Je souhaiterais également remercier tous mes amis au Québec, notamment Alexandra, Lorène, Fabien, Marion, Christelle, Fanny, Augustin, pour tous ces moments partagés ensemble. Une petite attention particulière pour toi Martine pour m'avoir fait découvrir la belle culture québécoise et pour cette merveilleuses aventure en pleine nature qui a scellé le début d'une très belle amitié !

Enfin, je ne remercierai jamais assez les personnes les plus importantes à mes yeux, à savoir mes parents mais également ma deuxième moitié Jeff, pour leur soutien infaillible, et pour avoir toujours cru en moi. Un grand MERCI à vous.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	IV
REMERCIEMENTS	VI
TABLE DES MATIERES.....	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Les changements globaux.....	1
1.2. Importance des bryophytes en forêt boréale.....	3
1.3. Facteurs limitants la fixation biologique de l'azote.....	6
1.4. Modèle d'étude : <i>Anabaena variabilis</i>	7
1.5. Objectif de l'étude et hypothèses.....	8
CHAPITRE 2.....	10
EFFECT OF MOLYBDENUM AND PHOSPHORUS ADDITIONS ON GROWTH AND NITROGEN FIXATION IN <i>ANABAENA VARIBILIS</i> UNDER ELEVATED CO ₂ WITH NITROGEN DEPOSITIONS.....	10
1.1. Mise en contexte et contribution des auteurs.....	10
2.1. Abstract.....	11
2.2. Introduction	12
2.3. Materials and methods.....	13
2.3.1. <i>Growth medium and experimental setup</i>	13
2.3.2. <i>Response variables</i>	14
2.3.3. <i>Statistical analyses</i>	15
2.4. Results	15
2.5. Discussion.....	19
2.5.1. <i>Effect of P addition on the chlorophyll concentration</i>	19
2.5.2. <i>Interaction between Mo and P additions on the chlorophyll concentration</i>	19
2.5.3. <i>Effect of P addition in ambient CO₂ and added N</i>	20
2.5.4. <i>Effect of Mo addition on ARA under elevated CO₂ without N</i>	21
2.6. Conclusion.....	21
2.7. Acknowledgments	22
2.8. References	22
CHAPITRE 3.....	28
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	28
3.1. Rappel des principaux résultats et interprétations	28
3.2. Conclusion.....	31
3.2.1. <i>Compromis entre C et N fixation</i>	31

3.2.2. <i>Avantages et inconvénients de l'approche expérimentale réductionniste</i>	32
3.3. Perspectives	34
3.3.1. <i>Estimation de la croissance des cyanobactéries filamenteuses ainsi que de leur potentiel de fixation biologique d'azote</i>	34
3.3.2. <i>Mécanismes impliqués dans la co-régulation des métabolismes du carbone et de l'azote</i>	35
3.3.3. <i>La fixation d'azote par les cyanobactéries à plus large échelle</i>	37
BIBLIOGRAPHIE	39

LISTE DES ABREVIATIONS

2-OG	2-oxoglutarate
ARA	Acetylene Reduction Assay
BNF	Biological Nitrogen Fixation
CCM	CO ₂ concentration mechanisms
FBN	Fixation Biologique de l'Azote
GIEC	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'évolution du climat
GS-GOGAT	Glutamine Synthétase - Glutamine Oxoglutarate AminoTransférase
IPCC	International Panel on Climate Change
Mo _{High}	Molybdène en concentration élevée
Mo _{Low}	Molybdène en faible concentration
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
OD ₇₂₀	Densité Optique mesurée à 720 nm
P _{High}	Phosphore en concentration élevée
P _{Low}	Phosphore à faible concentration
Ppm	Part Per Million

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Comparaison des avantages et inconvénients des différentes approches expérimentales en écologie. (D'après: J. Diamond, 1986).....	44
--	----

LISTE DES FIGURES

1. Évolution des dépositions atmosphériques d'azote total ($\text{mg N m}^{-2} \text{ an}^{-1}$) à l'échelle du globe pour les années 1860, 1990 ainsi que les prévisions pour 2050.....[9]
2. Schéma simplifié de la composition et du fonctionnement de la Mo-nitrogénase.....[12]
3. Effect of P molar concentration on the exponential growth rate, chlorophyll concentration and chlorophyll-specific ARA of *Anabaena variabilis* cultures grown under ambient CO_2 without N and under ambient CO_2 with added-N.....[23]
4. Effect of Mo and P molar concentrations on the exponential growth rate, chlorophyll concentration and chlorophyll-specific ARA of *Anabaena variabilis* cultures grown under elevated CO_2 without N and under elevated CO_2 with added-N.....[24]

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Les changements globaux

Le climat de la Terre varie naturellement au cours du temps et oscille entre des périodes glaciaires et des périodes plus chaudes (interglaciaires) (Petit *et al.* 1999). Ces variations climatiques peuvent avoir des causes naturelles telles que l'activité solaire (Solanki *et al.* 2004 ; Foukal *et al.* 2006), la variation de l'orbite de la Terre (Imbrie *et al.* 1984), ou bien des causes anthropiques liées aux activités humaines telles que la combustion des énergies fossiles (Levitus *et al.* 2001). Le terme changement climatique a été défini par la convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques (CCNUCC 1992, article premier) comme «des changements de climats attribués directement ou indirectement à une activité humaine, altérant la composition de l'atmosphère mondiale et qui viennent s'ajouter à la variabilité naturelle observée au cours de périodes comparables ».

Depuis l'ère pré-industrielle, les changements climatiques semblent survenir plus rapidement que par le passé. L'industrialisation ainsi que le développement et la combustion des énergies fossiles ont engendré une augmentation des rejets dans l'atmosphère des gaz à effet de serre, dont le dioxyde de carbone (CO₂) (Raupach *et al.* 2007 ; Canadell *et al.* 2007). La concentration atmosphérique mondiale en CO₂, évaluée par la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), à partir de 40 sites dispersés sur l'ensemble du globe, a augmenté de 120 ppm depuis le début de l'ère pré-industrielle. Selon la NOAA, la moitié de cette augmentation se serait produite depuis les années 1980. En mars 2015, la concentration moyenne de CO₂ dans l'atmosphère, mesurée à l'observatoire Mauna Loa à Hawaii, a dépassé le seuil des 400 ppm (NOAA, données ESRL/GMD). A l'échelle du globe, cette augmentation de la concentration des gaz à effet de serre contribue à accentuer l'effet de serre naturel et se traduit par un réchauffement de l'atmosphère. Selon les scénarios du cinquième rapport du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), la concentration

atmosphérique des gaz à effet de serre pourrait atteindre 750 à 1300 ppm (CO₂ eq) d'ici 2100, ce qui conduirait à une hausse moyenne des températures allant de 3.7 à 4.8°C par rapport à l'ère pré-industrielle (IPCC 2014).

En parallèle, la combustion des énergies fossiles ainsi que le développement des activités humaines, ont également engendré une augmentation de l'émission dans l'atmosphère d'azote (N) sous forme réactive (NO_x, NH_y) (Galloway *et al.* 2004). Cet azote réactif entre dans les écosystèmes via les dépositions atmosphériques (figure 1), soit sous forme sèche (poussière) soit sous forme humide (pluie, neige, brouillard).

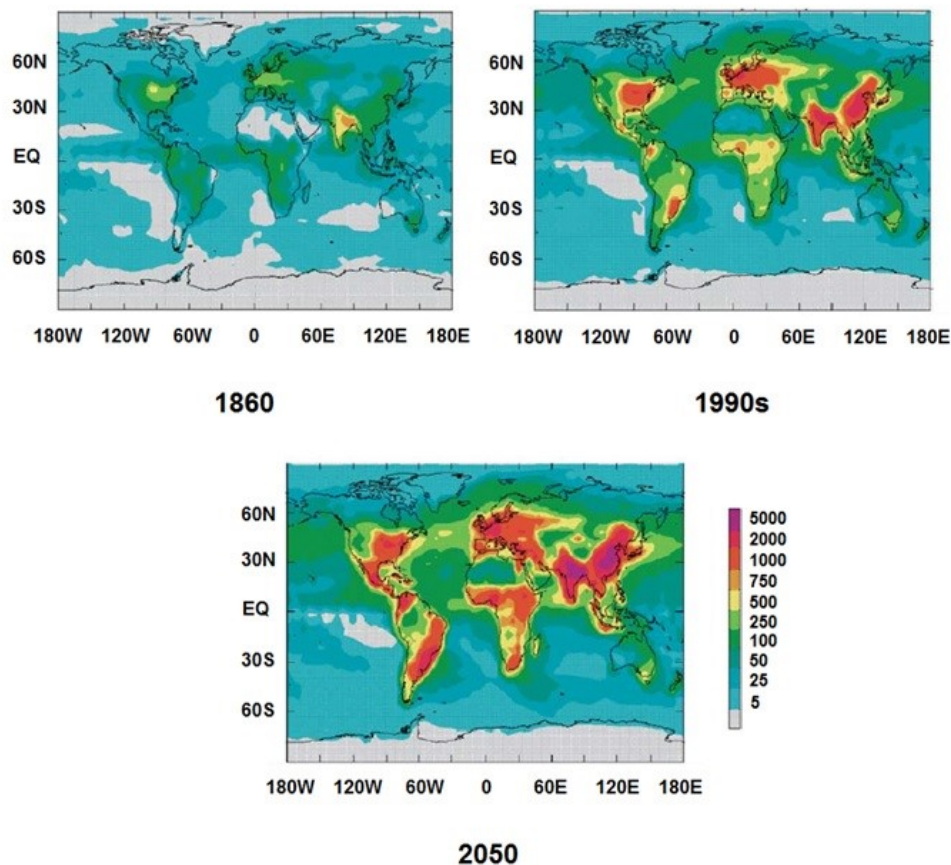


Figure 1 : Évolution des dépositions atmosphériques d'azote total (mg N m⁻² an⁻¹) à l'échelle du globe pour les années 1860, 1990 ainsi que les prévisions pour 2050 (Galloway *et al.* 2004).

Au Québec, les dépositions atmosphériques en azote total varient entre 2 et 11 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ et augmentent selon un gradient nord-sud (Ouimet *et al.* 2009). Cependant à proximité des grandes agglomérations, dans le nord des États-Unis et en Europe, les dépositions atmosphériques d'azote peuvent atteindre des taux avoisinant les 40 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Grulke and Balduman 1999 ; Galloway *et al.* 2004). L'azote exogène, apporté à 64% environ sous forme de nitrate (Ouimet *et al.* 2009), peut modifier la balance et le cyclage des éléments nutritifs (Aber *et al.* 2003 ; Galloway *et al.* 2004 ; Gu *et al.* 2010), notamment dans les biomes comme la forêt boréale où la productivité est limitée par la disponibilité de l'azote (Vitousek & Howarth 1991).

1.2. Importance des bryophytes en forêt boréale

La forêt boréale représente environ un tiers de la zone forestière de la planète. Le Canada en possède la deuxième plus vaste région après la Russie, avec une superficie de 5.8 million de km², ce qui représente près de 30% de la forêt boréale mondiale (Anielski & Wilson 2009). Ce biome possède d'importantes ressources naturelles et fournit de nombreux services écosystémiques. Par exemple, la forêt boréale contient environ un tiers des réserves de carbone continental (Climate Change 2007 ; Pan *et al.* 2011), ce qui en fait un facteur important impliqué dans le contrôle de notre futur climat. Les changements climatiques, comme l'augmentation de la température, pourraient engendrer une importante libération de ce C stocké dans le sol (fonte du pergélisol ou augmentation de la décomposition de la matière organique). De ce fait, si les rejets de C sont supérieurs à la séquestration du C dans la matière organique, il est possible que la forêt boréale devienne une importante source de CO₂ atmosphérique. Ceci entraînerait une boucle de rétroaction positive entre les changements climatiques en cours et la minéralisation des stocks de carbone (Lindroth *et al.* 1998 ; Goulden *et al.* 1998). Pour mieux comprendre et étudier cette question, il est important d'identifier certains des principaux groupes végétaux en forêt boréale et de comprendre comment ceux-ci réagiront en tant que sources et puits de carbone, face aux changements climatiques et atmosphériques en cours.

Les bryophytes sont une composante importante des communautés végétales en forêt boréale. Situés à l'interface des systèmes souterrain et aérien, les bryophytes retiennent une grande quantité d'eau et constituent un isolant thermique pour le sol (Blok *et al.* 2011 ; Gornall *et al.* 2007), ce qui ralentit la décomposition de la matière organique et maintient les stocks de carbone dans l'écosystème (Hollingsworth *et al.* 2008). Leur litière est également réputée pour se décomposer lentement (Hobbie *et al.* 2000 ; Turetsky *et al.* 2010), ce qui contribue davantage à ralentir les émissions de CO₂. D'autre part, les bryophytes représentent un puit important de CO₂ atmosphérique qui contribue au maintien des stocks terrestres de carbone. Par exemple, lors des successions secondaires suivant les feux, jusqu'à 20% de la productivité primaire nette de la forêt boréale est attribuable aux bryophytes (Turetsky *et al.* 2010), et celles-ci peuvent éventuellement couvrir 70% à 100 % de la surface du sol (Zachrisson *et al.* 2004).

Comme pour la plupart de végétaux en forêt boréale, la productivité des bryophytes est limitée principalement par la disponibilité en azote (N). Dans les pessières à mousses, la majorité de l'azote du sol se retrouve chimiquement liées à la matière organique qui s'accumule sous forme d'humus de type mor (rapport C/N >20). Cet azote est peu disponible aux végétaux, surtout aux bryophytes qui ne sont pas munis de racines. L'obtention de l'azote par les bryophytes se fait essentiellement grâce aux dépôts atmosphériques (2 à 11 kg N ha⁻¹ an⁻¹ au Québec, Ouimet *et al.* 2009) ainsi que par la fixation biologique d'azote (FBN), qui peut fournir de 0,5 à 3,5 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (DeLuca *et al.* 2002). La fixation biologique d'azote est effectuée par des cyanobactéries épiphytes associées aux bryophytes, dans des cellules spécialisées appelées hétérocystes. La réduction du N₂ atmosphérique dans la bryosphère est alors catalysée par un complexe enzymatique que l'on appelle nitrogénase. Ce complexe est constitué de deux protéines (figure 2), une sous-unité de fer-soufre (Fe-S) et un tétramère de molybdène-fer (Mo-Fe) contenant le site actif pour la réduction du N₂ en NH₃ (Rees *et al.* 2005). Afin de réduire une mole de N₂, cette nitrogénase va nécessiter l'apport de 16 moles d'ATP (Igarashi 2003).

Réaction de réduction du N₂ par la Mo nitrogenase (Igarashi 2003):

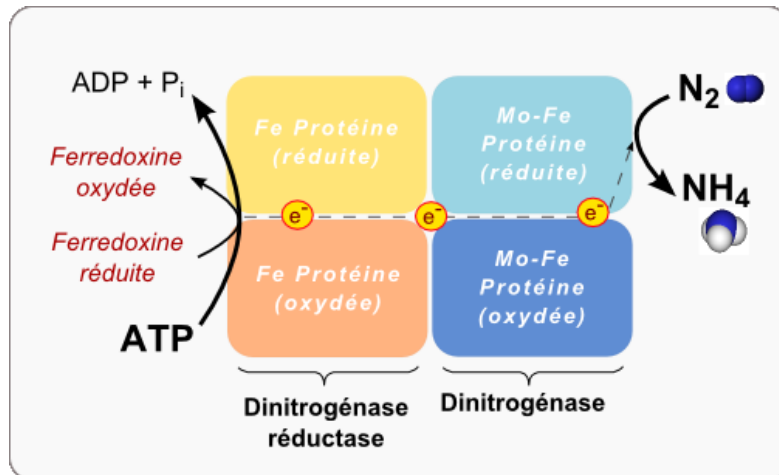
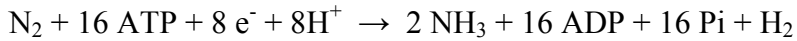


Figure 2 : Schéma simplifié de la composition et du fonctionnement de la Mo-nitrogénase. Les électrons nécessaires à la réduction du diazote sont transférés de la chaîne respiratoire via la ferredoxine, puis jusqu'au site actif où le N₂ sera réduit en NH₄.

Lorsque le molybdène est limitant dans l'environnement, certaines cyanobactéries pourraient exprimer, comme certaines bactéries fixatrices d'azote telles que *Azotobacter chroococcum* (Miller & Eady 1988), des nitrogénases dites alternatives (Kentemich *et al.* 1988 ; Thiel 1993 ; Zhang *et al.* 2016). Dans ces nitrogénases alternatives, le Mo contenu dans le site catalytique est remplacé soit par du Vanadium (V) dans la V-nitrogénase, soit par du Fer (Fe) dans la Fe-nitrogénase (Eady 1996). La V-nitrogénase exprimée par *Azotobacter chroococcum* semble être plus efficace que la Mo-nitrogénase, à basse température, pour réduire l'azote atmosphérique (Miller & Eady 1988). L'expression de nitrogénases alternatives pourrait donc permettre un maintien de la fixation biologique d'azote atmosphérique dans des conditions de température plus larges.

1.3. Facteurs limitants la fixation biologique de l'azote

Des études ont démontré que l'augmentation de la concentration atmosphérique de CO₂ pouvait stimuler la productivité de la forêt boréale (White *et al.* 2000), en stimulant la photosynthèse (Kirschbaum 2000), du moins à court-terme. Toutefois cette augmentation de productivité pourrait vite devenir limitée par la disponibilité des nutriments dans les sols, notamment de l'azote (Vitousek & Howarth 1991). Par contre, il est théoriquement possible que les taux de fixation d'azote soit également stimulés par l'augmentation de la concentration atmosphérique de CO₂ (e.g. Low-Décarie *et al.* 2011; Hutchins *et al.* 2015), ce qui pourrait maintenir une hausse de productivité forestière à long terme. Cependant cette augmentation de la fixation d'azote pourrait s'estomper en présence d'une augmentation des dépositions atmosphériques d'azote. Ceci s'explique par le fait que la FBN représente un coût énergétique important pour la cyanobactérie, qui n'aura donc pas besoin de dépenser ses ressources de carbone en présence d'une source exogène d'azote. Par exemple, Ackermann *et al.* (2012) ont noté une importante diminution de la FBN dans la bryosphère, le long des routes achalandées, au nord de la Suède. Leur étude a d'ailleurs confirmé une augmentation de la FBN en s'éloignant de ces routes, en lien avec un gradient décroissant en pollution azotée. Dans le même sens, Gundale *et al.* (2011) ont démontré une relation négative entre des apports expérimentaux en azote et la FBN dans la bryosphère. Il semble donc que l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ et les dépositions atmosphériques d'azote auront des effets contraires sur les taux de FBN. Il est donc important de tester l'effet interactif de ces deux facteurs sur la FBN des cyanobactéries.

Le Mo, qui est un cofacteur de la nitrogénase, est présent en faible quantité (1 ppm) dans la croûte continentale (Duval *et al.* 2015). Le phosphore (P) quant à lui, est un composant cellulaire impliqué dans la formation des membranes et des acides nucléiques, mais également dans le cycle de l'adénosine triphosphate (ATP), la devise énergétique qui intervient dans la FBN. Les effets de la disponibilité du Mo et du P sur la FBN ont été étudiés dans divers écosystèmes, allant de la forêt tropicale à la forêt boréale (e.g. Vitousek and Hobbie 2000;

Barron *et al.* 2009 ; Wurzburger *et al.* 2012 ; Jean *et al.* 2013) ainsi que dans les écosystèmes aquatiques et marins (e.g. Glass *et al.* 2012 ; Romero *et al.* 2013). Dans la majorité des cas, l'augmentation des disponibilités du Mo et du P semble stimuler l'activité de la nitrogénase (Wurzburger *et al.* 2012 ; Glass *et al.* 2010 ; Romero *et al.* 2013). Cependant certaines expériences menées en conditions naturelles avec des ajouts de P et Mo, ont été moins concluantes, montrant une absence d'effet sur la FBN (Gupta *et al.* 1991 ; Hartley and Schlesinger 2002 ; Zackrisson *et al.* 2009) ou un effet négatif (Smith *et al.* 1984). La complexité de la symbiose entre les bryophytes et les cyanobactéries rends également difficile l'étude de l'impact du Mo et du P sur la FBN, dans des conditions de CO₂ augmenté ou en présence d'une source exogène d'azote. De nombreux facteurs abiotiques peuvent influencer l'établissement de la symbiose bryophytes-cyanobactéries ainsi que les taux de FBN, tels que le taux d'humidité, la température ou la lumière (Zielke *et al.* 2002 ; Gundale *et al.* 2009 ; Jean *et al.* 2013 ; Gundale *et al.* 2012). Bay et son équipe (2013) ont suggéré que la colonisation des mousses par les cyanobactéries pouvait être contrôlée par les bryophytes, à travers la sécrétion de molécules chimiques permettant l'établissement de la symbiose. Les bryophytes peuvent être associées à différents genres de cyanobactéries tels que *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix* et *Stigonema* (Gentili *et al.* 2005 ; Houle *et al.* 2006 ; Ininbergs *et al.* 2011). Chacun de ces genres possède des optimaux de température pour le fonctionnement de la nitrogénase.

Cette complexité de la symbiose entraine souvent des biais pour l'étude des facteurs influençant les taux de FBN en milieu naturel. Il est par conséquent important de développer une approche méthodologique réductionniste permettant de s'affranchir des biais liés à la complexité des systèmes naturels.

1.4. Modèle d'étude : *Anabaena variabilis*

Anabaena variabilis est une cyanobactérie hétérocystique filamenteuse qui a fait l'objet de nombreuses études depuis les années 1970 (Wolk 1970), notamment dans les domaines de la physiologie (Kaplan *et al.* 1980 ; Meeks and Elhai 2002), de la génétique (Thiel 1999 ; Thiel

et al. 2004) ou de la biochimie (Pierce *et al.* 1969 ; Borodin *et al.* 2000 ; Bothe *et al.* 2010). Cette cyanobactérie photoautotrophe, que l'on peut retrouver à l'état libre ou en symbiose avec divers végétaux, est devenue un organisme modèle très utilisé en laboratoire, notamment pour l'étude de la FBN. *Anabaena variabilis* est une cyanobactérie ubiquitaire (Singh 2009) facilement cultivable en laboratoire (Allen and Arnon 1955) et qui réponds à de nombreux facteurs environnementaux (Kaplan *et al.* 1980 ; Sato *et al.* 1980 ; El-Gamal *et al.* 2008 ; Chinnasamy *et al.* 2011). Sa croissance est rapide avec un temps de doublement avoisinant les 36 h (Wolk & Shaffer 1976) et son génome a été entièrement séquencé (Thiel *et al.* 2014).

De plus, *A. variabilis*, qui est une cyanobactérie de la famille des *Nostocaceae*, est proche d'un point de vue phylogénétique du genre *Nostoc* (Thiel *et al.* 2014) que l'on retrouve fréquemment associé aux bryophytes (DeLuca *et al.* 2002 ; Gentili *et al.* 2005 ; Houle *et al.* 2006).

1.5. Objectif de l'étude et hypothèses

Des cultures d'*Anabaena variabilis* en phase exponentielle de croissance ont été utilisées afin de mesurer le taux de croissance, le contenu en chlorophylle ainsi que l'activité de la nitrogenase, pour des disponibilités en Mo et P faibles ou élevée. *Anabaena variabilis* a été cultivée dans quatre environnements différents, sous CO₂ augmenté ou ambiant, avec ou sans ajout d'azote.

L'augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique devrait stimuler la croissance des cyanobactéries en augmentant l'efficacité de la photosynthèse. Cette augmentation de la croissance devrait engendrer une augmentation de la demande en azote nécessaire au développement et au fonctionnement des cyanobactéries. En l'absence d'azote exogène, la fixation de l'azote atmosphérique constitue la seule source de nouvel azote disponible pour la croissance des cyanobactéries. Par conséquent, les taux de FBN devraient augmenter parallèlement aux taux de croissance. En présence d'azote minéral et dans des conditions de

CO₂ ambiant, l'azote apporté au milieu de croissance devrait réduire voire inhiber la FBN qui est coûteuse en énergie pour la cyanobactérie. En conditions de CO₂ augmenté, cet azote exogène pourrait ne pas être suffisant pour supporter l'augmentation de croissance engendrée par l'augmentation du CO₂ atmosphérique. Dans ce cas, la FBN pourrait être maintenue, et constituerait une source d'azote complémentaire à l'azote exogène, permettant ainsi de soutenir l'augmentation de croissance des cyanobactéries en conditions de CO₂ augmenté. Cependant, les taux de FBN devraient être dépendants des disponibilités du Mo et du P. Dans des conditions de CO₂ ambiant, la FBN pourrait être limitée par le Mo lorsque la disponibilité du P est élevée. Inversement, lorsque la disponibilité du P est faible, la FBN serait plutôt limitée par le P.

CHAPITRE 2
EFFECT OF MOLYBDENUM AND PHOSPHORUS ADDITIONS ON GROWTH AND
NITROGEN FIXATION IN *ANABAENA VARIBILIS* UNDER ELEVATED CO₂ WITH
NITROGEN DEPOSITIONS

C. Bringuier, R.L. Bradley, and J.-P. Bellenger

1.1. Mise en contexte et contribution des auteurs

La complexité des systèmes naturels rends difficile l'étude du rôle des disponibilités en Mo et P dans la réponse de la fixation biologique d'azote, face aux changements climatiques et atmosphériques. Nous avons donc tentés de déterminer ces effets des disponibilités du Mo et P sur la FBN, dans différentes conditions de CO₂ et d'apport exogène d'azote, à l'aide d'une approche expérimentale réductionniste utilisant des cultures pures de cyanobactéries. Pour ce faire, des cultures d'*Anabaena variabilis* en phase exponentielle de croissance ont été placées en chambre de croissance dans quatre conditions environnementales différentes combinant une concentration en CO₂ ambiante (400 ppm) ou augmentée (1000 ppm) et des apports ou non d'azote exogène (ajoutés sous la forme d'ammonium nitrate).

Notre étude a mis en évidence un effet significatif du P sur la quantité de chlorophylle dans les quatre conditions environnementales ainsi qu'une interaction significative entre le Mo et le P sur la variable chlorophylle, en conditions de CO₂ augmenté sans ajout d'azote. Cette interaction pourrait être le signe d'un compromis entre l'acquisition de C via la photosynthèse et la fixation d'azote. Enfin le P semble engendrer une diminution du taux de croissance associée à une augmentation de l'activité de la nitrogénase, dans les conditions de CO₂ ambiant avec ajout d'azote. Cet effet contraire du P à haute concentration pourrait être le résultat d'un changement de la stratégie de croissance de la cyanobactérie filamenteuse. Celle-

ci pourrait investir dans la formation de cellules plus petites ainsi que dans la différenciation d'hétérocystes à haut P.

L'article sera prochainement soumis au journal *Environmental Microbiology Reports*. La première auteure Charline Bringuier a participé à l'élaboration du protocole expérimental, aux analyses en laboratoire, aux analyses statistiques ainsi qu'à la rédaction, sous la supervision de son directeur de recherche le professeur Robert Bradley (Université de Sherbrooke) ainsi que de son co-directeur le professeur Jean-Philippe Bellenger (Université de Sherbrooke).

2.1. Abstract

Biological nitrogen fixation (BNF) is a process that may respond positively to increased atmospheric CO₂ but negatively to increased N deposition. However, the singular and interactive effects of CO₂ and N deposition on BNF rates could depend on the nutrient balance in soils (mostly Mo and P) and are highly variable and inconsistent under field conditions. We tested the relative effects of Mo and P on BNF and growth rates of *Anabaena variabilis*, grown under ambient or elevated CO₂, with or without N additions in the form of NH₄NO₃. We show that the chlorophyll concentration is increased by high P concentrations under all four environmental conditions. Under ambient CO₂ and added N, the repression of the nitrogenase activity by the added nitrogen observed under low P concentrations seemed to be removed by P addition under ambient CO₂. This higher activity of the nitrogenase with high P concentration is accompanied by a reduced growth rate. Moreover there is a significant interaction between Mo and P additions under elevated CO₂ without N. All together, these effects could indicate that the response of *A. variabilis* to elevated CO₂ and/or N deposition seems to be the result of a trade-off between the acquisition of carbon and nitrogen fixation.

Keywords: Biological nitrogen fixation, elevated CO₂, nitrogen deposition, molybdenum, phosphorus, *Anabaena variabilis*.

2.2. Introduction

Since the industrial revolution, atmospheric carbon dioxide (CO₂) concentrations have steadily risen and have recently exceeded 400 ppm (Dlugokencky and Tans, NOAA/ESRL). Furthermore, based on projected CO₂ emission rates, these atmospheric concentrations could double to 800 ppm before the end of the current century (IPCC). Meanwhile, industrial emissions and fossil fuel combustion have also contributed large amounts of gaseous nitrous oxides to the atmosphere, which can be transported and deposited onto ecosystems located hundreds of kilometers from their source. For example, nitrogen (N) deposition in forested areas bordering major North American cities may reach >40 kg ha⁻¹ y⁻¹ (Grulke and Balduman 1999), comprising more than half of the total N annual input to these ecosystems (Nadelhoffer *et al.* 1999). It is expected that the combined effects of increasing atmospheric CO₂ and N deposition will shift the nutrient balance controlling major biological processes (Elser *et al.* 2009; Sardans *et al.* 2012).

Biological nitrogen fixation (BNF) is one such process that may respond positively to increased atmospheric CO₂ (Hutchins *et al.* 2015) and negatively to increased N deposition (Ackermann *et al.* 2012). Although few studies have tested the relative importance, or the interactive effects, of these two global change factors, there is some evidence that N deposition will exert a stronger control on BNF rates than elevated CO₂ (Berthrong *et al.* 2014). That generalization may not hold, however, as the singular and interactive effects of CO₂ and N deposition could also depend on the nutrient balance in soils. For example, molybdenum (Mo) is an important component of the nitrogenase enzyme that is responsible for fixing atmospheric N, but it is also scarce in the earth's crust (ca. 1 ppm) (Wedepohl 1995; Kabata-Pendias 2010). Likewise, phosphorus (P) is an important component of adenosine triphosphate (ATP) used to transfer the energy required for reducing atmospheric N₂, but its bioavailability in soils is often low. Accordingly, several studies have revealed positive effects of Mo and/or P additions on BNF rates (Silvester 1989; Hafner *et al.* 1992; Vieira *et al.* 1998; Benner *et al.* 2007; Bellenger *et al.* 2011; Barron *et al.* 2009; Wurzbürger *et al.* 2012), but

such results remain highly variable and inconsistent under field conditions (Smith *et al.* 1984; Gupta *et al.* 1991; Hartley and Schlesinger 2002; Zackrisson *et al.* 2009). There is a need, therefore, to test the relative effects of Mo and P on BNF rates under elevated CO₂ and N deposition, using a reductionist methodological approach to remove bias and noise encountered under field conditions.

Anabaena variabilis is a filamentous cyanobacterium which is capable of photosynthesis and of reducing atmospheric dinitrogen to amino form in specialized cells called heterocysts. *A. variabilis* is a model organism for studying the response of BNF to environmental and nutritional factors because it grows fast (Wolk and Shaffer 1976), it responds well to changes in environmental conditions (Kaplan *et al.* 1980; Sato *et al.* 1980; El-Gamal *et al.* 2008; Chinnasamy *et al.* 2011) and it can be easily cultured in the laboratory (Allen and Arnon 1955). We thus report on a study where we measured the exponential growth rate, chlorophyll content and nitrogenase activity of *A. variabilis* cultures grown under high and low Mo and P concentrations in four different environments, namely at ambient or elevated CO₂, with or without added N.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Growth medium and experimental setup

The experiment consisted of four experimental factors (CO₂, N, Mo and P) crossed in a factorial design. Given that four-way interactions are difficult to interpret, and given the objectives of our study, the design and subsequent analysis of the data was simplified as a 2 x 2 factorial design testing the effects of Mo and P concentrations under four environmental conditions. The environmental conditions were themselves the product of a 2 x 2 factorial design of CO₂ and N concentrations.

A. variabilis (ATCC 29413) was grown in continuous cultures (100 ml) using an eight fold dilution (AA/8) of the Allen and Arnon medium (Allen & Arnon, 1955). The medium, which is N-free, was modified for two Mo ($6.5 \cdot 10^{-9}$ M and $6.5 \cdot 10^{-8}$ M) and two P ($2.5 \cdot 10^{-6}$ M and $2.5 \cdot 10^{-5}$ M) concentrations that match the low range of continental environmental concentrations (Sohm *et al.* 2011; Glass *et al.* 2012). Initial tests, in which we independently manipulated Mo and P concentrations over 5 orders of magnitude, had determined that the two Mo and P concentrations chosen for the present study were sufficient to maintain optimal growth of *A. variabilis* at ambient CO₂ and temperature conditions. The pH of the medium was set to 8.2 using HEPES buffer (0.5 M) and the cultures were grown under continuous agitation (125 rpm) in growth chambers. These four treatments were applied in triplicate to each of the four environmental conditions (N = 48). The two N concentrations were either 0 (i.e. non-amended medium) or 10^{-5} M, applied as NH₄NO₃, whereas the two CO₂ concentrations in the growth chambers were 400 and 1000 ppm.

2.3.2. Response variables

Growth rates were estimated from the optical density (OD_{720nm}) of cultures during the exponential growth phase (Glass *et al.* 2010; Thiel & Pratte 2013), from an optical density (OD) of 0.01 up to 0.06 (5 generations). An exponential regression was generated for each culture and the equation of the growth curve was used to estimate the doubling time (DT). The growth rate (μ) was calculate using the formula $\mu = \ln(2) / DT$.

Chlorophyll was extracted in 90% methanol (MacKinney 1941) from 1.5 ml aliquots of cultures collected at the end of the exponential growth phase (i.e. at OD_{720nm} = 0.06). The absorption of light was measured by spectrophotometry (SpectraMax 250, Molecular Devices LLC., USA) at both 665 and 750 nm and these values were used to calculate the concentration of chlorophyll in the cultures (Sartory & Grobbelaar 1984).

Nitrogenase activity was estimated by the acetylene reduction assay (ARA) (Hardy *et al.* 1968). Aliquots (2 ml) of each culture were collected at the end of the exponential growth phase, and these were transferred into 20 ml clear glass vials. The vials had previously been soaked for 24 hours in a 10% HCl solution and then rinsed with ultrapure water to remove all contaminants. The vials were sealed with septa caps and 10% of the air volume was replaced by acetylene gas. The vials were then shaken at 125 rpm for 4 h in a growth chamber. Gas samples (3 ml) were taken every 2 hours and analyzed on a gas chromatograph with a flame ionization detector (GC-8A, Shimadzu, Japan) for the detection and quantification of ethylene gas. Relative nitrogenase activity was then calculated as the chlorophyll-specific ARA (nmole ethylene.h⁻¹.μg chlorophyll⁻¹).

2.3.3. Statistical analyses

We used two-way ANOVA to test the main effects of Mo and P concentrations, as well as their interactions, on the growth rate, chlorophyll content and nitrogenase activity of *A. variabilis* for each combination of CO₂ and N conditions. When significant interactions were found, we tested the effects of Mo concentration within each P concentration using a t-test. For the condition “elevated CO₂ with N”, the cultures with low Mo and P concentrations didn’t reach the end of the exponential growth phase. The lack of these data required that we test the effects of the remaining three Mo-P combinations using one-way ANOVA, followed by *post hoc* Tukey tests. All analyses were performed with the R software version 3.2.2 (R Development Core Team 2015).

2.4. Results

At ambient CO₂ concentration and without N in the growth medium, we only found a significant and positive effect ($P = 0.001$) of P concentration on mean chlorophyll concentration of *A. variabilis* cultures (Fig. 1c).

At ambient CO₂ concentration and with N added to the growth medium, we found significant effects of P concentrations on all three response variables (Fig. 1b,d,f). More specifically, growth was higher at low P concentrations ($P = 0.020$), whereas chlorophyll and chlorophyll-specific ARA were higher at high P concentrations ($P = 0.002$ and 0.015 respectively).

At elevated CO₂ concentration and without N added in the growth medium, there was a significant effect of P ($P = 0.005$), with higher chlorophyll found at the high P concentration (Fig. 4c). In the same growing environment, we also found a significant Mo x P interaction ($P = 0.047$) controlling chlorophyll concentrations (Fig. 2c). Subsequent t-tests revealed significantly higher chlorophyll at the high Mo concentration when P was low ($t = 0.014$), but not so when P was high.

At elevated CO₂ concentration and with N added to the growth medium, growth of *A. variabilis* with low Mo and low P did not reach the end of the exponential phase, as previously mentioned. One way ANOVA revealed a significant effect ($P = 0.002$) among the remaining three Mo-P combinations on chlorophyll concentrations. Subsequently, a Tukey test found a significantly higher chlorophyll concentration at high P (both Mo concentrations) than at low P + high Mo (Fig. 2d).

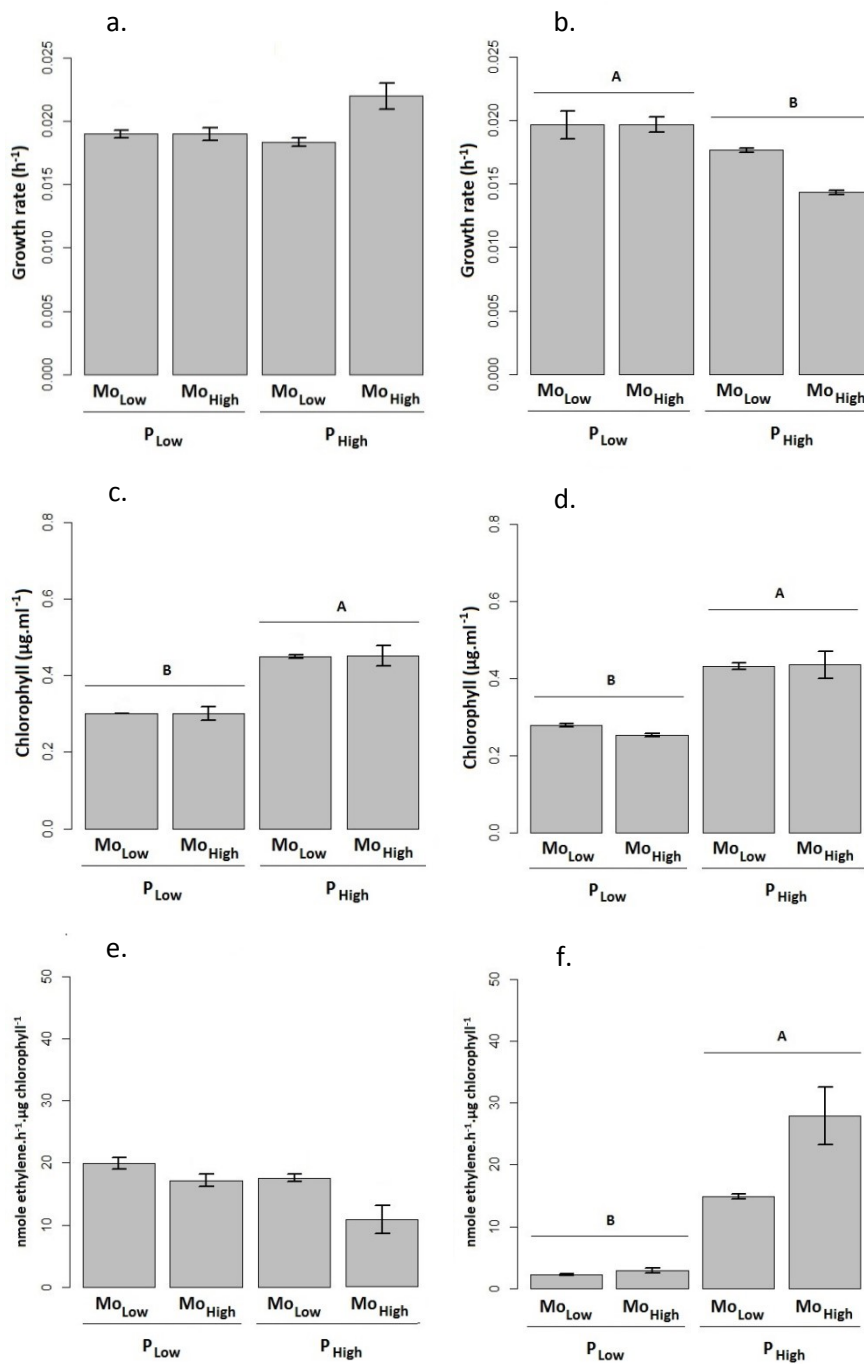


Figure 1: Effect of P molar concentration on the exponential growth rate, chlorophyll concentration and chlorophyll-specific ARA of *Anabaena variabilis* cultures grown under ambient CO₂ without N (Fig. 1a,c,e) and under ambient CO₂ with added-N (Fig. 1b,d,f). Bar clusters with different upper-case letters designate significant main effects of P (n = 3).

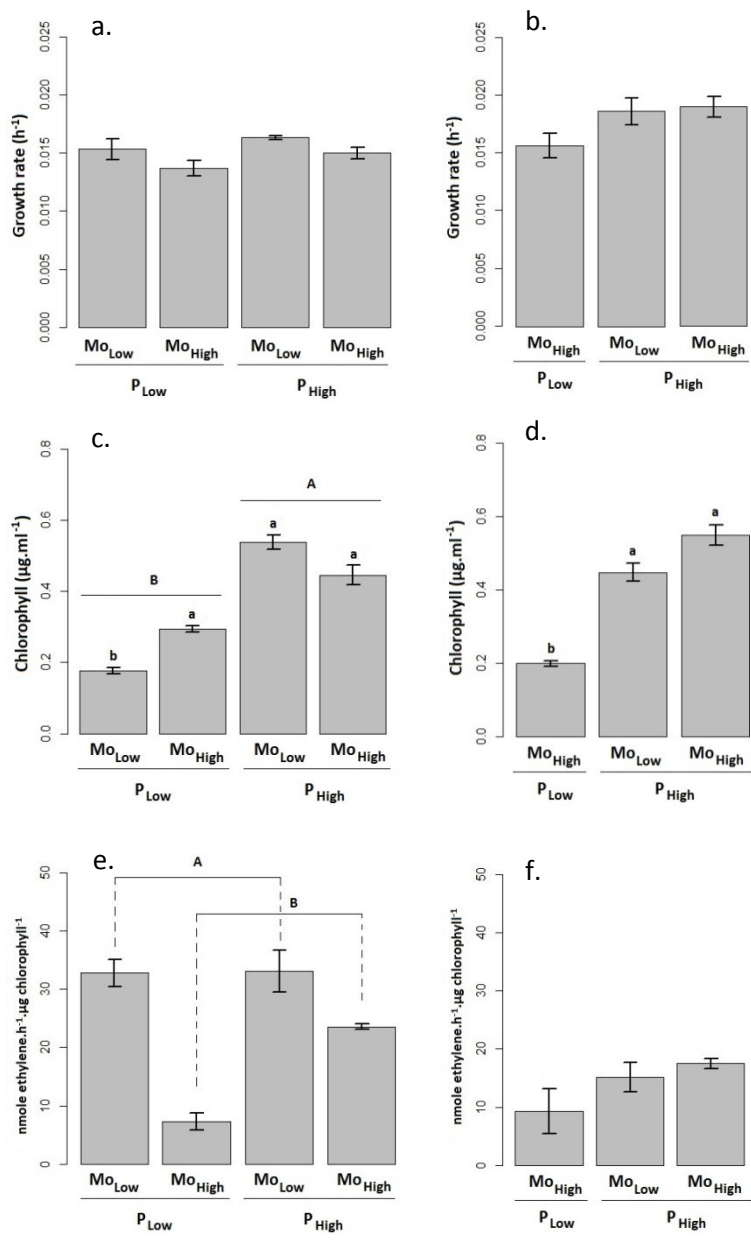


Figure 2: Effect of Mo and P molar concentrations on the exponential growth rate, chlorophyll concentration and chlorophyll-specific ARA of *Anabaena variabilis* cultures grown under elevated CO_2 without N (Fig. 2a,c,e) and under elevated CO_2 with added-N (Fig. 2b,d,f). Bar clusters with different upper-case letters designate significant main effects of either Mo or P ($n = 3$). Different lower-case letters designate significant effects of Mo within a given level of P (Fig. 2a,c,e) or different treatment means as determined from 1-way ANOVA and Tukey tests (Fig. 2b,d,f).

2.5. Discussion

Taken collectively, our results confirmed that Mo and P availability could affect BNF rates; however the effect on the BNF rates will be dependent on the CO₂ and N status of the environment. Accordingly, here we will discuss the global effect of P on the chlorophyll concentration and the significant effects of Mo and/or P in each of the four specific environmental conditions.

2.5.1. *Effect of P addition on the chlorophyll concentration*

Under all four environmental conditions, the increase of the chlorophyll concentration under P additions is consistent with the results of many previous studies indicating that freshwater primary production is generally limited by P (Schindler 1977; Elser *et al.* 2007; Elser *et al.* 2009). P concentration can affect the biosynthesis rates of chlorophyll precursors thus affecting the chlorophyll content and the photosynthetic rates (Wu *et al.* 2006; Chen *et al.* 2011). However in our study, this increase of the chlorophyll content is not accompanied by an increase of the growth rate. This seems to indicate that our *A. variabilis* cultures are producing more chlorophyll than needed for the growth (luxury production).

2.5.2. *Interaction between Mo and P additions on the chlorophyll concentration*

The interaction between Mo and P additions under elevated CO₂ could be the result of a trade-off between C and N fixation that are two energy and reductant consuming processes. Cyanobacteria have developed CO₂ concentrating mechanisms (CCMs) to facilitate the transport and the accumulation of the inorganic carbon around the active site of the Rubisco (Badger & Price 2003; Price *et al.* 2008). Those mechanisms developed by the cyanobacteria to enhance the photosynthetic efficiency under low CO₂ concentrations, have high energetic and metabolic costs. Under elevated CO₂, the diffusion and the assimilation of the inorganic carbon are easier and the CCMs activity seems downregulated (Price *et al.* 2008; Rishiram *et*

al. 2012). The energy and the reductive power used for the synthesis of CCM related proteins and involved in CCM activity could be shunted towards other energy demanding processes as the nitrogen fixation (Beardall & Giordano 2002). This trade-off between C fixation and N fixation could allow cultures under elevated CO₂ with low P to achieve the same photosynthetic efficiency as cultures under ambient CO₂ with high P, but with smaller chlorophyll content and with no changes of the growth rate.

2.5.3. *Effect of P addition in ambient CO₂ and added N*

Under ambient CO₂ and added N conditions, the addition of P removes the repression of the nitrogenase activity induced by the added N but seems to slightly lower the growth rate compared to low P conditions. This reduced growth rate observed under N and P additions could represent an artefact caused by the proxy used to estimate the growth of the cyanobacteria. The optical density of the culture is a measure that could be biased by the growth strategy of cyanobacteria and that is insensitive to morphological changes of cells (size or form of heterocysts and vegetative cells). In response to changing environmental factors as CO₂ or nutrient concentrations, some cyanobacteria can invest in growth by increasing their cell volume or elemental quotas (Fu *et al.* 2007; Levitan *et al.* 2007; Czerny *et al.* 2009) instead of showing increasing cell division rate. Under N and P enrichment, the nitrogen assimilated by the cyanobacteria could be invested in the photosynthetic machinery (Arroniz-Crespo *et al.* 2008), affecting the composition and the ratio of photosynthetic pigments (Arroniz-Crespo *et al.* 2008; Ochua-Hueso *et al.* 2014). N could also be accumulated in the form of storage molecules as cyanophycin granules (polymer of aspartic acid and arginine) in the cytoplasm or as amino acids (Li *et al.* 2001; Picossi *et al.* 2004; Kolodny *et al.* 2006). These changes of growth strategy of the culture could suggest physiological priorities either towards carbon fixation or nutrient acquisition.

2.5.4. Effect of Mo addition on ARA under elevated CO₂ without N

The effect of Mo on BNF rates under elevated CO₂ concentration could be linked to the growth status of the culture of *A. variabilis*. During the exponential phase of growth, the cells tend to have a higher metabolic efficiency. It could be assumed that this phase could allow an uptake of nitrogen that exceeds the needs of the cyanobacteria (luxury consumption). The N accumulated can be invested in the photosynthetic machinery (Arroniz-Crespo *et al.* 2008; Ochua-Hueso *et al.* 2014) or store for a further use in molecules as amino acids or cyanophycin (Li *et al.* 2001; Picossi *et al.* 2004; Kolodny *et al.* 2006). Under elevated CO₂, this luxury consumption could be facilitated by the reduced CCM activity. The energy and reductive power invested in the transport and accumulation of inorganic carbon around the rubisco enzyme under ambient CO₂ concentration could be reallocated to the accumulation and storage of nitrogen. At high Mo, the cells could have fixed enough nitrogen at the end of the exponential growth phase. In that case, the activity of the nitrogenase could slow down and the energy supplying the nitrogen fixation could be relocated towards carbon fixation. This lower rate of N fixation under high Mo concentration could be the result of an efficient trade-off between nitrogen acquisition and carbon fixation.

2.6. Conclusion

Response of the cyanobacteria to the experimental conditions seems to be the result of a trade-off between the processes of carbon and nitrogen acquisition that require a high metabolic efficiency (nutrient, energy and reductive agents). This high metabolic control seems to be dependent on the nutrients availability and more precisely on the balance between nitrogen and phosphorus. It seems that cyanobacteria are efficient organisms able to adjust their metabolism in response to environmental changes, investing either in carbon fixation and/or in nutrient acquisition and accumulation.

Further studies are needed to shed light on the mechanisms involved in the regulation of metabolism during the exponential phase of growth, especially the mechanisms involved in the trade-off between carbon fixation (photosynthesis) and nitrogen fixation. BNF performed by the cyanobacteria is an important process in ecosystems where the productivity is N-limited. The adaptation of cyanobacteria to the upcoming changes such as increasing CO₂ concentration and atmospheric depositions of nitrogen could represent an important factor in the adaptation of ecosystems to global changes.

2.7. Acknowledgments

This project was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

2.8. References

Allen, M. B., & Arnon, D. I. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology*, *30*(4), 366.

Ackermann, K., Zackrisson, O., Rousk, J., Jones, D. L., & DeLuca, T. H. (2012). N₂ fixation in feather mosses is a sensitive indicator of N deposition in boreal forests. *Ecosystems*, *15*(6), 986-998.

Arróniz-Crespo, M., Leake, J. R., Horton, P., & Phoenix, G. K. (2008). Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilisation in acidic grassland. *New Phytologist*, *180*(4), 864-874.

Badger, M. R., & Price, G. D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental botany*, *54*(383), 609-622.

Barron, A. R., Wurzburger, N., Bellenger, J. P., Wright, S. J., Kraepiel, A. M., & Hedin, L. O. (2009). Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nature Geoscience*, *2*(1), 42-45.

- Beardall, J., & Giordano, M. (2002). Ecological implications of microalgal and cyanobacterial CO₂ concentrating mechanisms, and their regulation. *Functional Plant Biology*, 29(3), 335-347.
- Bellenger, J. P., Wichard, T., Xu, Y., & Kraepiel, A. M. L. (2011). Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N₂-fixing bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1395-1411.
- Benner, J. W., Conroy, S., Lunch, C. K., Toyoda, N., & Vitousek, P. M. (2007). Phosphorus fertilization increases the abundance and nitrogenase activity of the cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian montane forests. *Biotropica*, 39(3), 400-405
- Berthrong, S. T., Yeager, C. M., Gallegos-Graves, L., Steven, B., Eichorst, S. A., Jackson, R. B., & Kuske, C. R. (2014). Nitrogen Fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO₂. *Applied and environmental microbiology*, 80(10), 3103-3112.
- Chen, M., Li, J., Dai, X., Sun, Y., & Chen, F. (2011). Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Limnology*, 12(2), 187-192.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Goyal, S. K., & Das, K. C. (2009). Carbon and nitrogen fixation by *Anabaena fertilissima* under elevated CO₂ and temperature. *Journal of Freshwater Ecology*, 24(4), 587-596.
- Czerny, J., Barcelos e Ramos, J., & Riebesell, U. (2009). Influence of elevated CO₂ concentrations on cell division and nitrogen fixation rates in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Biogeosciences (BG)*, 6(9), 1865-1875.
- Dlugokencky E., Tans P., NOAA/ESRL (www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/)
- El-Gamal, A. D., Ghanem, N. A., El-Ayouty, E. Y., & El-Belely, E. F. (2008). Differential responses of *Anabaena variabilis* and *Nostoc linckia* to salt stress and their role in improvement the growth conditions of some salt stressed plant seedlings. *International Conference for Enhancing Scientific Research: New Horizons*. Tanta Conference Hall 20-21 February 2008: PP 1-10
- Elser, J. J., Bracken, M. E., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., ... & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 10(12), 1135-1142.

Elser, J. J., Andersen, T., Baron, J. S., Bergström, A. K., Jansson, M., Kyle, M., ... & Hessen, D. O. (2009). Shifts in lake N: P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition. *science*, 326(5954), 835-837.

Fu, F. X., Warner, M. E., Zhang, Y., Feng, Y., & Hutchins, D. A. (2007). Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 43(3), 485-496.

Glass, J. B., Wolfe-Simon, F., Elser, J. J., & Anbar, A. D. (2010). Molybdenum-nitrogen co-limitation in freshwater and coastal heterocystous cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 55(2), 667-676.

Glass, J. B., Axler, R. P., Chandra, S., & Goldman, C. R. (2012). Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems and pure cultures. *Frontiers in microbiology*, 3.

Grulke, N. E., & Balduman, L. (1999). Deciduous conifers: high N deposition and O₃ exposure effects on growth and biomass allocation in ponderosa pine. In *Forest Growth Responses to the Pollution Climate of the 21st Century* (pp. 235-248). Springer Netherlands.

Gupta, G., Grund, B., & Narayanan, R. (1991). Photosynthesis and nitrogenase activity in soybean treated with sulphur dioxide and molybdenum. *Plant Science*, 79(2), 157-161.

Hafner, H., Ndunguru, B. J., Bationo, A., & Marschner, H. (1992). Effect of nitrogen, phosphorus and molybdenum application on growth and symbiotic N₂-fixation of groundnut in an acid sandy soil in Niger. *Fertilizer Research*, 31(1), 69-77.

Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology*, 43(8), 1185-1207.

Hartley, A. E., & Schlesinger, W. H. (2002). Potential environmental controls on nitrogenase activity in biological crusts of the northern Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments*, 52(3), 293-304.

Hutchins, D. A., Walworth, N. G., Webb, E. A., Saito, M. A., Moran, D., McIlvin, M. R., ... & Fu, F. X. (2015). Irreversibly increased nitrogen fixation in *Trichodesmium* experimentally adapted to elevated carbon dioxide. *Nature communications*, 6.

IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace elements in soils and plants*. CRC press.

Kaplan, A., Badger, M. R., & Berry, J. A. (1980). Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentration. *Planta*, 149(3), 219-226.

Kolodny, N. H., Bauer, D., Bryce, K., Klucevsek, K., Lane, A., Medeiros, L., & Wright, J. (2006). Effect of nitrogen source on cyanophycin synthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC 6308. *Journal of bacteriology*, 188(3), 934-940.

Levitan, O., Rosenberg, G., Setlik, I., Setlikova, E., Grigel, J., Klepetar, J., ... & Berman-Frank, I. (2007). Elevated CO₂ enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Global Change Biology*, 13(2), 531-538.

Li, H., Sherman, D. M., Bao, S., & Sherman, L. A. (2001). Pattern of cyanophycin accumulation in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing cyanobacteria. *Archives of microbiology*, 176(1-2), 9-18.

Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. biol. Chem*, 140(2), 315-322.

Nadelhoffer, K. J., Emmett, B. A., Gundersen, P., Kjønaas, O. J., Koopmans, C. J., Schleppi, P., Tietema, A., & Wright, R. F. (1999). Nitrogen deposition makes a minor contribution to carbon sequestration in temperate forests. *Nature*, 398 (6723), 145-148.

Ochoa-Hueso, R., Paradela, C., Pérez-Corona, M. E., & Manrique, E. (2014). Pigment ratios of the Mediterranean bryophyte *Pleurochaete squarrosa* respond to simulated nitrogen deposition.

Picossi, S., Valladares, A., Flores, E., & Herrero, A. (2004). Nitrogen-regulated genes for the metabolism of cyanophycin, a bacterial nitrogen reserve polymer. Expression and mutational analysis of two cyanophycin synthetase and cyanophycinase gene clusters in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11582-11592.

Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J., & 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(7), 1441-1461.

R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>

- Rishiram, R., Nadimuthu, V., Saravana Devi, S., Krishnamurthi, K., & Tapan, C. (2012). Influence of CO₂ concentration on carbon concentrating mechanisms in cyanobacteria and green algae: a proteomic approach. *Algae*, 27(4), 295-301.
- Rousk, K., Jones, D. L., & DeLuca, T. H. (2013). Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Frontiers in microbiology*, 4.
- Rousk, K., Jones, D. L., & DeLuca, T. H. (2014). Exposure to nitrogen does not eliminate N₂ fixation in the feather moss *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. *Plant and soil*, 374(1-2), 513-521.
- Sardans, J., Rivas-Ubach, A., & Peñuelas, J. (2012). The C: N: P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: a review and perspectives. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14(1), 33-47.
- Sato, N., & Murata, N. (1980). Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: the central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 619(2), 353-366.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195(4275), 260-262.
- Silvester, W. B. (1989). Molybdenum limitation of symbiotic nitrogen fixation in forests of Pacific Northwest America. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(2), 283-289.
- Smith, V. R. (1984). Effects of abiotic factors on acetylene reduction by cyanobacteria epiphytic on moss at a subantarctic island. *Applied and environmental microbiology*, 48(3), 594-600.
- Sohm, J. A., Webb, E. A., & Capone, D. G. (2011). Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7), 499-508.
- Thiel, T., & Pratte, B. S. (2013). Alternative nitrogenases in *Anabaena variabilis*: the role of molybdate and vanadate in nitrogenase gene. *Advances in Microbiology*, 2013.
- Vieira, R. F., Cardoso, E. J. B. N., Vieira, C., & Cassini, S. T. A. (1998). Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. *Journal of Plant nutrition*, 21(1), 169-180.
- Wedepohl, K. H. (1995). The composition of the continental crust. *Geochimica et cosmochimica Acta*, 59(7), 1217-1232.

Wolk, C. P., & Shaffer, P. W. (1976). Heterotrophic micro-and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Archives of microbiology*, *110*(2-3), 145-147.

Wu, C., Wang, Z., Sun, H., & Guo, S. (2006). Effects of different concentrations of nitrogen and phosphorus on chlorophyll biosynthesis, chlorophyll a fluorescence, and photosynthesis in *Larix olgensis* seedlings. *Frontiers of Forestry in China*, *1*(2), 170-175.

Wurzburger, N., Bellenger, J. P., Kraepiel, A. M., & Hedin, L. O. (2012). Molybdenum and phosphorus interact to constrain asymbiotic nitrogen fixation in tropical forests.

Zackrisson, O., DeLuca, T. H., Gentili, F., Sellstedt, A., & Jäderlund, A. (2009). Nitrogen fixation in mixed *Hylocomium splendens* moss communities. *Oecologia*, *160*(2), 309-319.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

3.1. Rappel des principaux résultats et interprétations

Ce projet avait pour but d'étudier, à l'aide d'une approche méthodologique réductionniste, les effets du Mo et du P sur la croissance ainsi que sur les taux de fixation biologique de l'azote chez la cyanobactérie *A. variabilis*, et ce dans quatre conditions de croissance : en CO₂ ambiant ou augmenté, avec ou sans ajout d'azote exogène.

Nous avons pu mettre en évidence un effet systématique du P sur la chlorophylle, avec une augmentation de la quantité de chlorophylle pour une concentration en P élevée ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M). Cette augmentation de la chlorophylle pourrait se traduire par une augmentation de la photosynthèse (Wu *et al.* 2006) et semble donc cohérent avec de nombreuses études plaçant le P comme principal élément limitant la productivité primaire dans les lacs (Schindler 1977; Elser *et al.* 2007; Elser *et al.* 2009). Cependant dans notre étude, le taux de croissance n'est pas significativement différent à haut P. *A. variabilis* semble donc produire plus de chlorophylle que nécessaire pour sa croissance. Cette production de luxe de chlorophylle pourrait représenter un avantage pour la cyanobactérie en lui permettant pas exemple de s'adapter à des conditions de faible luminosité.

L'effet du croisement entre le Mo et P sur la concentration de la chlorophylle, en conditions de CO₂ élevée, sans ajout d'azote, pourrait être expliqué par un compromis entre l'acquisition du C et la fixation d'azote. Certaines études semblent montrer qu'une modification du ratio N:P pouvait altérer la composition ainsi que le ratio des pigments photosynthétiques, favorisant la synthèse de la chlorophylle à faible concentrations de P, en présence d'azote (Arroniz-Crespo *et al.* 2008 ; Ochoa-Hueso *et al.* 2014). En conditions de CO₂ élevée, l'activité réduite des mécanismes facilitant l'accumulation et le transport du C inorganique (CCM, Rishiram *et al.*

2012) pourrait permettre à *A. variabilis* d'ajuster son métabolisme en fonction du ratio N:P, et potentiellement de favoriser tantôt la fixation de l'azote, tantôt l'acquisition du C.

La diminution du taux de croissance associée à une augmentation de l'activité de la nitrogénase, observée à haut P et dans des conditions de CO₂ ambiant avec ajout d'azote, pourrait être liée à une différence de stratégie de croissance des cyanobactéries. Certaines études ont montré que les facteurs environnementaux tels que le CO₂ (Levitan *et al.* 2007 ; Czerny *et al.* 2009), ou la disponibilité en P (Chen *et al.* 2011), pouvaient influencer la longueur des filaments ainsi que le volume des cellules ou le taux de division. Le volume des cellules de la cyanobactérie unicellulaire *Microcystis* semble être négativement corrélé avec la concentration en P du milieu de croissance (Chen *et al.* 2011). De plus, l'augmentation du CO₂ atmosphérique semble tantôt stimuler la division cellulaire chez *Trichodesmium* (cyanobactérie non hétérocystique), augmentant ainsi la longueur des filaments et la biomasse cellulaire (Levitan *et al.* 2007), tantôt diminuer le taux de division cellulaire chez la cyanobactérie hétérocystique *Nodularia* (Czerny *et al.* 2009). Dans notre étude, à haut P, *A. variabilis* pourrait investir dans la formation de cellules végétatives de plus petites tailles ainsi que dans la différenciation d'hétérocystes, contrairement à des conditions de croissance à faible P, où le nombre de cellules serait plus faible mais leur volume plus élevé. Ceci pourrait permettre une gestion plus efficace du P par les cyanobactéries dans des conditions de faibles concentrations en P.

Dans ces mêmes conditions de croissance, en CO₂ ambiant en présence d'azote, on notera qu'à faible P, l'ajout d'azote semble réduire l'activité de la nitrogénase, indépendamment de la concentration en Mo (Meeks *et al.* 1983 ; Mulholland *et al.* 2001 ; Holl *et al.* 2005 ; Vintila *et al.* 2007 ; Ackermann *et al.* 2012). L'assimilation de l'azote ajouté au milieu sous forme minérale (NH₄⁺, NO₃⁻) est moins coûteuse en terme d'énergie et de pouvoir réducteur consommé par la cyanobactérie, que la réduction de l'azote atmosphérique par la nitrogénase (Meeks *et al.* 1983 ; Mulholland *et al.* 2001 ; Holl *et al.* 2005).

Cette étude a mis en évidence un effet significatif du Mo sur l'activité de la nitrogénase dans des conditions de CO₂ élevée sans ajout d'azote, avec une diminution de l'ARA à haut Mo. Cet effet du Mo, sur l'activité de la nitrogénase est contraire à ce qui est rapporté dans la littérature pour les organismes fixateurs d'azote (e.g. cyanobactéries : Glass *et al.* 2012 ; FBN dans le sol et les litières : Wurzbürger *et al.* 2012 ; Jean *et al.* 2013). Dans notre étude, la réduction de l'activité de la nitrogénase pourrait être expliquée par une efficacité métabolique de la FBN plus importante, dans des conditions de CO₂ augmenté et à haut Mo, notamment lorsque les concentrations en P sont faibles ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M). Dans ces conditions de CO₂ augmenté et à haut Mo, la cyanobactérie pourrait atteindre plus rapidement son quota d'azote fixé, ce qui engendrerait une réduction de l'activité de la nitrogénase lors de la fin de phase exponentielle de croissance. Cette diminution de l'activité de la nitrogénase qui semble plus importante lorsque les concentrations en P sont faibles, pourrait permettre une réallocation des ressources allouées à la fixation d'azote (énergie et pouvoir réducteur) à d'autres processus importants tels que la photosynthèse.

Enfin nous avons observé un effet négatif de l'ajout d'azote dans des conditions de CO₂ augmenté, à faible Mo et P. Ces cultures n'ont pas atteint la fin de la phase exponentielle et sont entrées en phase de déclin après quelques jours de croissance. Ce déclin des cultures à faible Mo et P pourrait suggérer une limitation de la croissance à CO₂ augmenté, soit par le Mo, soit par le P. Certaines études ont déjà mis en évidence une limitation de croissance par le P dans des conditions d'enrichissement en N, se traduisant par une augmentation de l'activité des phosphomonoestérases permettant l'augmentation de la disponibilité du P (Phoenix *et al.* 2003 ; Arroniz-Crespo *et al.* 2008 ; Hogan *et al.* 2010). De plus, à très faible concentration, le Mo pourrait non seulement réduire la croissance en limitant l'activité de la nitrogénase (Glass *et al.* 2012 ; Wurzbürger *et al.* 2012) mais également, de par son rôle de cofacteur de la nitrate réductase (Nicholas *et al.* 1954b), en limitant l'assimilation de l'azote minéral (Nicholas *et al.* 1954a ; Axler *et al.* 1980 ; Glass *et al.* 2012), et ce même si les besoins en Mo de la nitrogénase sont de 2 à 3 ordres de grandeurs supérieurs à ceux de la nitrate réductase (Sprent & Raven 1985).

3.2. Conclusion

3.2.1. *Compromis entre C et N fixation*

Un compromis entre l'acquisition de carbone et la fixation d'azote pourrait permettre aux cyanobactéries d'être moins sensibles aux stress environnementaux comme la disponibilité en P dans notre étude. Lorsque les concentrations en P sont faibles, les cyanobactéries pourraient favoriser l'acquisition et le stockage d'azote au dépend de la fixation de C. L'azote accumulé par la cellule pourrait par la suite être investi dans la machinerie photosynthétique (Arroniz-Crespo *et al.* 2008 ; Ochoa-Hueso *et al.* 2014), ou stocké sous forme de molécules comme les acides aminés ou la cyanophycine (Li *et al.* 2001 ; Picossi *et al.* 2004 ; Kolodny *et al.* 2006). Cette cyanophycine, qui est un polymère composé d'arginine et d'acide aspartique, peut s'accumuler en présence d'azote, sous forme de granules dans le cytoplasme des cellules. La synthèse de la cyanophycine, par catalyse enzymatique, semble plus importante dans des conditions de CO₂ augmenté ou de faibles concentrations en P (Allen 1984).

Pour les cyanobactéries hétérocystiques, la régulation des métabolismes de l'azote et du C semble être un facteur important dans l'adaptation des colonies aux changements environnementaux. En effet pour ces cyanobactéries, les fonctions de fixation d'azote et de C sont spatialement séparées. L'énergie (ATP) et le pouvoir réducteur (NADPH et ferredoxine) utilisés par l'hétérocyste pour la fixation de l'azote, peuvent être fournis soit via le photosystème I à l'intérieur de l'hétérocyste grâce à un transfert cyclique ou linéaire d'électron (Tel-Or & Stewart 1977 ; Peterson *et al.* 1981 ; Schrautemeier & Böhme 1985 ; Cardona *et al.* 2009), soit par les cellules végétatives adjacentes grâce à la voie des pentoses phosphates (Wolk *et al.* 1994). L'azote fixé à l'intérieur de l'hétérocyste est incorporé aux acides aminés, avant d'être redistribué aux cellules végétatives, notamment sous forme d'acide glutamique et d'arginine (Bohme 1998). Ces échanges entre cellules végétatives et hétérocystes, notamment le transport d'acide aminé sous forme passive (faible affinité) ou sous forme active (haute affinité) de l'hétérocyste vers les cellules végétatives (Montesinos *et*

al. 1995), pourraient être influencés par la disponibilité du P (pour les transports ATP dépendants) ou le pH (via le système des carbonates).

3.2.2. *Avantages et inconvénients de l'approche expérimentale réductionniste*

Tous les types d'approches expérimentales ne sont pas équivalents lorsque l'on tente de déterminer les effets de facteurs environnementaux (e.g CO₂) sur certaines fonctions écologiques comme la fixation d'azote (Diamond 1986). Dans le domaine de la recherche en écologie, Diamond (1986) distingue trois grands types d'approches expérimentales :

- les approches de laboratoires (Laboratory Experiments LEs),
- les approches de terrain (Field Experiments FEs),
- les approches en milieu naturel (Natural Experiments NEs) qui regroupent :
 - o les Natural Trajectory Experiments (NTEs), consistant à comparer une communauté, avant, pendant et après une perturbation,
 - o et les Natural Snapshot Experiments (NSEs), consistant à comparer des communautés naturelles qui diffèrent pour une caractéristique particulière.

Les avantages et inconvénients de ces différents types d'approches sont analysés selon huit axes (compromis) regroupant le contrôle des variables environnementales, la correspondance des sites d'étude, la capacité de suivre une trajectoire, les échelles spatio-temporelles, la portée, le réalisme et la généralité (Tableau 1) (Diamond 1986).

Les approches expérimentales de laboratoire comme celle utilisée pour cette étude manquent de réalisme et sont souvent réalisées sur de courtes échelles spatiotemporelles, ce qui restreint considérablement la portée des conclusions de l'étude (tableau 1). Cependant, ce type d'approche est communément employée par les chimistes et microbiologistes, car elle permet de contrôler de façon assez précise les variables biotiques (e.g disponibilité des nutriments) et abiotiques (e.g lumière, température) influençant le système expérimental (tableau 1).

Tableau 1: Comparaison des avantages et inconvénients des différentes approches expérimentales en écologie. (D'après: J. Diamond, 1986).

Charateristic	Laboratory	Field	Natural Trajectory	Natural Snapshot
Regulation of independant variables	Highest	Medium/Low	None	None
Site matching	Highest	Medium	Medium/Low	Lowest
Ability to follow trajectory	Yes	Yes	Yes	None
Maximum temporal scale	Lowest	Lowest	Highest	Highest
Maxium spatial scale	Lowest	Low	Highest	Highest
Scope (range of manipulations)	Lowest	Medium/Low	Medium/Low	Highest
Realism	None/Low	High	Highest	Highest
Generality	None	Low	High	High

L'approche expérimentale de laboratoire permet également de limiter la part de variabilité non expliquée que l'on retrouve entre différentes unités expérimentales notamment pour des communautés naturelles (tableau 1). Dans le cas de la FBN en forêt boréale, une part de cette variabilité est due à l'association symbiotique entre les bryophytes et les cyanobactéries. Comparé aux formes libres, les cyanobactéries en associations avec les bryophytes subissent différentes modifications de leur métabolisme suite à l'établissement de la symbiose (diminution de l'activité photosynthétique, augmentation de l'activité de fixation biologique d'azote, Meeks 1998). Les bryophytes semblent également contrôler la colonisation des cyanobactéries en réponse à certains facteurs environnementaux (e.g. la disponibilité en azote) notamment grâce à la libération d'un signal chimique (HIF pour hormogonia-inducing factor) induisant la formation de courts filaments motiles (hormogonies) chez la cyanobactérie, et de substances chimio-attractantes attirant les hormogonies vers leur hôtes (Bay *et al.* 2013). La réponse de la FBN face aux changements globaux peut donc être dépendante de la réponse de l'hôte. Un tel type d'approche expérimentale réductionniste, permettant de s'affranchir de la symbiose en ne prenant en compte que la cyanobactérie, pourrait donc permettre d'élucider les

différents mécanismes impliqués dans la réponse de la fixation biologique d'azote face aux différents facteurs environnementaux étudiés.

3.3. Perspectives

3.3.1. Estimation de la croissance des cyanobactéries filamenteuses ainsi que de leur potentiel de fixation biologique d'azote.

La mesure de la densité optique (OD_{720}) semble être ici un mauvais estimateur de la croissance puisqu'elle ne donne aucun renseignement sur la morphologie cellulaire des cyanobactéries filamenteuses. Un autre proxy qui peut être employé pour estimer la croissance des cyanobactéries est la chlorophylle (Levitan *et al.* 2007 ; Low-décarie *et al.* 2011) dont la concentration est souvent reliée à la disponibilité du P et à la productivité primaire. Cependant ce proxy peut être influencé par de nombreux facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, le CO_2 ou la disponibilité en N. Enfin, tout comme la mesure de la densité optique des cultures de cyanobactéries, la mesure de la quantité de chlorophylle ne donne aucun renseignement sur un possible changement de forme ou de volume des cellules.

Il aurait été intéressant de pouvoir mesurer la longueur des filaments ainsi que le volume et la forme des cellules lors de notre étude. De telles mesures morphologiques auraient été complémentaires aux mesures de fixations d'azote, de taux de croissance et de quantité de chlorophylle, et auraient pu permettre de déterminer la stratégie de croissance utilisée par *A. variabilis* dans les différentes conditions expérimentales (CO_2 , N, Mo et P). Les techniques de cytométrie en flux, basées sur la fluorescence de la chlorophylle, pourraient permettre la séparation et le comptage des différents types cellulaires (ratio cellule végétative vs. hétérocyste). Une modification de l'acquisition du carbone ou de l'azote dans des conditions de CO_2 augmenté pourrait être expliquée par un changement du ratio cellules végétatives/hétérocystes au sein des colonies de cyanobactéries. L'augmentation de la demande en azote, dans des conditions de CO_2 atmosphérique augmenté, pourrait se traduire

par une augmentation de la fréquence des hétérocystes, pouvant permettre l'augmentation de la fixation d'azote et de la croissance. Les techniques de cytométrie en flux pourraient également permettre de caractériser la morphologie des cellules (forme et volume), mais également de tester les effets de différentes variables environnementales (CO₂, nutriments) sur la morphologie des colonies de cyanobactéries. Par exemple, les cyanobactéries filamenteuses pourraient tantôt investir dans des filaments courts composés de cellules volumineuses lorsque les concentrations en P sont faibles, tantôt investir dans des filaments plus longs mais composés de cellules plus petites lorsque les concentrations en P seraient plus élevées.

La normalisation par la quantité de chlorophylle de la quantité d'éthylène produite par la nitrogénase, ne semble pas non plus être un très bon indicateur du potentiel de fixation biologique de l'azote. En effet la concentration en chlorophylle peut être influencée par la disponibilité du P, mais également par la température ou le CO₂. Une normalisation par la densité optique des cultures ne semble pas plus appropriée puisqu'elle semble être un mauvais estimateur de la croissance des cyanobactéries, notamment lorsque celle-ci implique des changements de morphologie. Il pourrait être envisageable de normaliser l'ARA par une mesure de biomasse des cyanobactéries, cependant, quel que soit la normalisation utilisée, il semble essentiel de combiner l'estimation du potentiel de fixation d'azote à d'autres mesures permettant d'évaluer la croissance des cyanobactéries. Des mesures de morphologie cellulaire, de croissances cellulaires (e.g OD, chlorophylle ou comptage), de ratio C:N:P, associées à des mesures de capacité de fixation d'azote et de carbone pourraient permettre d'avoir une bonne idée des stratégies de croissance des cyanobactéries filamenteuses mais également de caractériser les effets de facteurs environnementaux (e.g augmentation du CO₂, dépositions azotées) sur ces différentes stratégies.

3.3.2. Mécanismes impliqués dans la co-régulation des métabolismes du carbone et de l'azote

Une modification des facteurs environnementaux devrait influencer le métabolisme des cyanobactéries, leur permettant de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. Il

serait intéressant de caractériser ces mécanismes, notamment les mécanismes impliqués dans le compromis entre l'acquisition du C et la fixation d'azote.

Certaines études semblent déjà indiquer que les métabolismes du carbone et de l'azote seraient régulés par le niveau de 2-oxoglutarate (2-OG) dans la cellule (Muro-pastor *et al.* 2001 ; Ohashi *et al.* 2010). Cet intermédiaire du cycle de Krebs pourrait représenter un facteur clé dans le compromis entre C et N, en informant les cellules sur leur statut en N (Ohashi *et al.* 2010). Certaines études ont déjà tenté de caractériser les cascades réactionnelles contrôlées par le 2-OG (Muro-pastor *et al.* 2005 ; Espinosa *et al.* 2006 ; Zhang & Zhao 2008), ainsi que l'influence de la disponibilité de l'azote sur ces cascades (Forchhammer 2004 ; Ohashi *et al.* 2010). Dans des conditions de limitations en azote, le 2-OG s'accumule dans la cellule en raison d'une activité réduite du cycle GS-GOGAT (Glutamine Synthétase - Glutamine Oxoglutarate AminoTransférase) qui permet l'assimilation de l'ammonium (Muro-pastor *et al.* 2005). L'accumulation de 2-OG dans la cellule engendre l'activation du facteur de transcription NtcA impliqué dans la transcription des gènes d'assimilation du nitrate (Espinosa *et al.* 2006 ; Zhang & Zhao 2008 ; Ohashi *et al.* 2010). Dans des conditions de faible disponibilité en azote, l'excès de 2-OG favorise également la formation d'un complexe entre PipX, une protéine spécifique des cyanobactéries, et le facteur de transcription NtcA. Ce complexe formé est impliqué dans la transcription des gènes de la nitrogénase dont l'opéron *nifHDK* (Forchhammer 2004 ; Ohashi *et al.* 2010) ainsi que dans la différenciation des hétérocystes (Muro-pastor *et al.* 2002). Ces nombreuses études semblent indiquer que les cyanobactéries sont capables de réguler leur métabolisme en fonction de la disponibilité en azote dans leur environnement. Cependant aucune étude à ce jour n'a tenté de déterminer l'effet de l'augmentation du CO₂ atmosphérique et des disponibilités en, Mo et P sur ces cascades impliquées dans la régulation des métabolismes de l'azote et du carbone, durant la phase exponentielle de croissance.

3.3.3. La fixation d'azote par les cyanobactéries à plus large échelle

La fixation biologique de l'azote par les cyanobactéries représente une source d'azote non négligeable, notamment dans les écosystèmes comme la forêt boréale où la productivité primaire est limitée par la disponibilité de l'azote. En forêt boréale, les cyanobactéries fixatrices d'azote sont souvent en association symbiotique avec des organismes supérieurs comme les mousses ou les lichens. L'établissement de ces relations symbiotiques pourrait faciliter l'accès aux nutriments, notamment l'azote. En effet, une partie de l'azote fixé par les cyanobactéries semble être transféré et incorporé aux tissus de leurs hôtes (Rai *et al.* 2002 ; Turetsky 2003 ; Bay *et al.* 2013). Dans le cas de l'association de *Nostoc spp.*- *Sphagnum*, plus de 35 % de l'azote fixé par la cyanobactérie semble être alloué à la formation de biomasse chez la sphaigne (Berg *et al.* 2013). Pour d'autres types d'associations, notamment chez les lichens, les hépatiques ou les anthocérotes, le transfert d'azote entre la cyanobactérie et l'hôte peut atteindre jusqu'à 90% de l'azote fixé par la cyanobactérie (Meeks *et al.* 1983 ; Rai *et al.* 2000).

Il pourrait être intéressant de développer des approches expérimentales de terrain qui permettraient de gagner en réalisme tout en maintenant un certain niveau de contrôle sur les variables environnementales (tableau 1). L'utilisation de microcosmes ou d'Open-Top Chambers (OTCs), permettant la manipulation des concentrations en CO₂ et l'apport des nutriments (N, P et métaux), pourrait permettre d'une part de mettre en évidence les facteurs influençant les bryophytes ainsi que la symbiose avec les cyanobactéries, mais également de déterminer l'effet de la combinaison de ces facteurs sur les taux de fixation d'azote.

De telles approches expérimentales pourraient permettre de tester l'effet de changements climatiques sur la fixation biologique de l'azote dans des conditions naturelles, en forêt boréale. L'utilisation d'azote marqué permettrait d'étudier le devenir de l'azote fixé par les cyanobactéries associées aux mousses et de mettre en évidence les potentiels transferts d'azote entre les mousses et les autres végétaux. La productivité de la forêt boréale étant limité par la

disponibilité de l'azote, une augmentation des taux de fixation d'azote chez les cyanobactéries pourrait par exemple, influencer la régénération des essences forestières comme l'épinette, notamment grâce au transfert de l'azote fixé via un réseau mycorhizien.

BIBLIOGRAPHIE

- Aber, J. D., Goodale, C. L., Ollinger, S. V., Smith, M. L., Magill, A. H., Martin, M. E., ... & Stoddard, J. L. (2003). Is nitrogen deposition altering the nitrogen status of northeastern forests? *BioScience*, 53(4), 375-389.
- Allen, M. B., & Arnon, D. I. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology*, 30(4), 366.
- Allen, M. M. (1984). Cyanobacterial cell inclusions. *Annual Reviews in Microbiology*, 38(1), 1-25.
- Ackermann, K., Zackrisson, O., Rousk, J., Jones, D. L., & DeLuca, T. H. (2012). N₂ fixation in feather mosses is a sensitive indicator of N deposition in boreal forests. *Ecosystems*, 15(6), 986-998.
- Anielski M & Wilson S. 2009. Les chiffres qui comptent vraiment : évaluation de la valeur réelle des écosystèmes boréaux du Canada. Institut Pembina, Initiative Boréale Canadienne, ISBN0-9733409-3-2.
- Arróniz-Crespo, M., Leake, J. R., Horton, P., & Phoenix, G. K. (2008). Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilisation in acidic grassland. *New Phytologist*, 180(4), 864-874.
- Axler, R. P., Gersberg, R. M., & Goldman, C. R. (1980). Stimulation of nitrate uptake and photosynthesis by molybdenum in Castle Lake, California. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 37(4), 707-712.
- Barcelos e Ramos, J., Biswas, H., Schulz, K. G., LaRoche, J., & Riebesell, U. (2007). Effect of rising atmospheric carbon dioxide on the marine nitrogen fixer *Trichodesmium*. *Global biogeochemical cycles*, 21(2).
- Barron, A. R., Wurzbarger, N., Bellenger, J. P., Wright, S. J., Kraepiel, A. M., & Hedin, L. O. (2009). Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nature Geoscience*, 2(1), 42-45.
- Bay, G., Nahar, N., Oubre, M., Whitehouse, M. J., Wardle, D. A., Zackrisson, O., ... & Rasmussen, U. (2013). Boreal feather mosses secrete chemical signals to gain nitrogen. *New Phytologist*, 200(1), 54-60.

Bellenger, J. P., Wichard, T., Kustka, A. B., & Kraepiel, A. M. L. (2008). Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. *Nature Geoscience*, 1(4), 243-246.

Blok, D., Heijmans, M. M. P. D., Schaepman-Strub, G., Van Ruijven, J., Parmentier, F. J. W., Maximov, T. C., & Berendse, F. (2011). The cooling capacity of mosses: controls on water and energy fluxes in a Siberian tundra site. *Ecosystems*, 14(7), 1055-1065.

Böhme, H. (1998). Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends in Plant Science*, 3(9), 346-351.

Borodin V.B., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O. (2000). Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions. *Biotechnology & Bioengineering* 69(5, 5 Sep), 478-485.

Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M. G., & Newton, W. E. (2010). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(4), 529-551.

Canadell, J. G., Le Quéré, C., Raupach, M. R., Field, C. B., Buitenhuis, E. T., Ciais, P., ... & Marland, G. (2007). Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104(47), 18866-18870.

Cardona, T., Battchikova, N., Zhang, P., Stensjö, K., Aro, E. M., Lindblad, P., & Magnuson, A. (2009). Electron transfer protein complexes in the thylakoid membranes of heterocysts from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(4), 252-263.

Chen, M., Li, J., Dai, X., Sun, Y., & Chen, F. (2011). Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Limnology*, 12(2), 187-192.

Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Goyal, S. K., & Das, K. C. (2009). Carbon and nitrogen fixation by *Anabaena fertilissima* under elevated CO₂ and temperature. *Journal of Freshwater Ecology*, 24(4), 587-596.

Climate change (2007). Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

Czerny, J., Barcelos e Ramos, J., & Riebesell, U. (2009). Influence of elevated CO₂ concentrations on cell division and nitrogen fixation rates in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Biogeosciences (BG)*, 6(9), 1865-1875.

- DeLuca, T. H., Zackrisson, O., Nilsson, M. C., & Sellstedt, A. (2002). Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature*, 419(6910), 917-920.
- Diamond, J. (1986). Overview: laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. *Community ecology*, 3-22.
- Duval, B.D., S.M. Natali, and B.A. Hungate. 2015. What Constitutes Plant Available Molybdenum in Sandy Acidic Soils? *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 46:318-326.
- Eady, R. R. (1996). Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 3013-3030.
- Edwards, E. J., McCaffery, S., & Evans, J. R. (2006). Phosphorus availability and elevated CO₂ affect biological nitrogen fixation and nutrient fluxes in a clover-dominated sward. *New Phytologist*, 169(1), 157-167.
- El-Gamal, A. D., Ghanem, N. A., El-Ayouty, E. Y., & El-Belely, E. F. (2008). Differential responses of *Anabaena variabilis* and *Nostoc linckia* to salt stress and their role in improvement the growth conditions of some salt stressed plant seedlings. *International Conference for Enhancing Scientific Research: New Horizons*. Tanta Conference Hall 20-21 February 2008: PP 1-10
- Elser, J. J., Bracken, M. E., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., ... & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 10(12), 1135-1142.
- Elser, J. J., Andersen, T., Baron, J. S., Bergström, A. K., Jansson, M., Kyle, M., ... & Hessen, D. O. (2009). Shifts in lake N: P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition. *science*, 326(5954), 835-837.
- Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S., & Contreras, A. (2006). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Molecular microbiology*, 61(2), 457-469.
- Foukal, P., Fröhlich, C., Spruit, H., & Wigley, T. M. L. (2006). Variations in solar luminosity and their effect on the Earth's climate. *Nature*, 443(7108), 161-166.
- Forchhammer, K. (2004). Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS microbiology reviews*, 28(3), 319-333.

- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., ... & Karl, D. M. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153-226.
- Gentili, F., Nilsson, M. C., Zackrisson, O., DeLuca, T. H., & Sellstedt, A. (2005). Physiological and molecular diversity of feather moss associative N₂-fixing cyanobacteria. *Journal of experimental botany*, 56(422), 3121-3127.
- Glass, J. B., Wolfe-Simon, F., Elser, J. J., & Anbar, A. D. (2010). Molybdenum-nitrogen co-limitation in freshwater and coastal heterocystous cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 55(2), 667-676.
- Glass, J. B., Axler, R. P., Chandra, S., & Goldman, C. R. (2012). Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems and pure cultures. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Glass, J. B., Axler, R. P., Chandra, S., & Goldman, C. R. (2015). Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems and pure cultures. *Beyond the Iron age: the ecological relevance of bioactive trace metals other than Fe and organic growth factors in aquatic systems*, 7.
- Gornall, J. L., Jónsdóttir, I. S., Woodin, S. J., & Van der Wal, R. (2007). Arctic mosses govern below-ground environment and ecosystem processes. *Oecologia*, 153(4), 931-941.
- Goulden, M. L., Wofsy, S. C., Harden, J. W., Trumbore, S. E., Crill, P. M., Gower, S. T., ... & Bazzaz, A. (1998). Sensitivity of boreal forest carbon balance to soil thaw. *Science*, 279(5348), 214-217.
- Gu, F., Zhang, Y., Tao, B., Wang, Q., Yu, G., Zhang, L., & Li, K. (2010). Modeling the effects of nitrogen deposition on carbon budget in two temperate forests. *Ecological Complexity*, 7(2), 139-148.
- Gundale, M. J., Gustafsson, H., & Nilsson, M. C. (2009). The sensitivity of nitrogen fixation by a feathermoss-cyanobacteria association to litter and moisture variability in young and old boreal forests. *Canadian journal of forest research*, 39(12), 2542-2549.
- Gundale, M. J., Deluca, T. H., & Nordin, A. (2011). Bryophytes attenuate anthropogenic nitrogen inputs in boreal forests. *Global Change Biology*, 17(8), 2743-2753.
- Gupta, G., Grund, B., & Narayanan, R. (1991). Photosynthesis and nitrogenase activity in soybean treated with sulphur dioxide and molybdenum. *Plant Science*, 79(2), 157-161.

- Grulke, N. E., & Balduman, L. (1999). Deciduous conifers: high N deposition and O₃ exposure effects on growth and biomass allocation in *Ponderosa pine*. In *Forest Growth Responses to the Pollution Climate of the 21st Century* (pp. 235-248). Springer Netherlands.
- Hartley, A. E., & Schlesinger, W. H. (2002). Potential environmental controls on nitrogenase activity in biological crusts of the northern Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments*, 52(3), 293-304.
- Hobbie, S. E., Schimel, J. P., Trumbore, S. E., & Randerson, J. R. (2000). Controls over carbon storage and turnover in high-latitude soils. *Global Change Biology*, 6(S1), 196-210.
- Holl, C. M., & Montoya, J. P. (2005). Interactions between nitrate uptake and nitrogen fixation in continuous cultures of the marine diazotroph *Trichodesmium* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 41(6), 1178-1183.
- Hollingsworth, T. N., Schuur, E. A. G., Chapin III, F. S., & Walker, M. D. (2008). Plant community composition as a predictor of regional soil carbon storage in Alaskan boreal black spruce ecosystems. *Ecosystems*, 11(4), 629-642.
- Hogan, E. J., Minnullina, G., Sheppard, L. J., Leith, I. D., & Crittenden, P. D. (2010). Response of phosphomonoesterase activity in the lichen *Cladonia portentosa* to nitrogen and phosphorus enrichment in a field manipulation experiment. *New Phytologist*, 186(4), 926-933.
- Houle, D., Bilodeau Gauthier, S., Paquet, S., Planas, D., & Warren, A. (2006). Identification of two genera of N₂-fixing cyanobacteria growing on three feather moss species in boreal forests of Quebec, Canada. *Botany*, 84(6), 1025-1029.
- Hutchins, D. A., Walworth, N. G., Webb, E. A., Saito, M. A., Moran, D., McIlvin, M. R., ... & Fu, F. X. (2015). Irreversibly increased nitrogen fixation in *Trichodesmium* experimentally adapted to elevated carbon dioxide. *Nature communications*, 6.
- Igarashi, R. Y., & Seefeldt, L. C. (2003). Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4), 351-384.
- Imbrie, J., Hays, J. D., Martinson, D. G., McIntyre, A., Mix, A. C., Morley, J. J., ... & Shackleton, N. J. (1984). The orbital theory of Pleistocene climate: Support from a revised chronology of the marine delta¹⁸O record. In *Milankovitch and climate: Understanding the response to astronomical forcing* (Vol. 1, p. 269).
- Ininbergs, K., Bay, G., Rasmussen, U., Wardle, D. A., & Nilsson, M. C. (2011). Composition and diversity of nifH genes of nitrogen-fixing cyanobacteria associated with boreal forest feather mosses. *New Phytologist*, 192(2), 507-517.

IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

Jean, M. E., Phalyvong, K., Forest-Drolet, J., & Bellenger, J. P. (2013). Molybdenum and phosphorus limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Eastern Canada: influence of vegetative cover and seasonal variability. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 140-146.

Kaplan, A., Badger, M. R., & Berry, J. A. (1980). Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentration. *Planta*, 149(3), 219-226.

Kentemich, T., Danneberg, G., Hundeshagen, B., & Bothe, H. (1988). Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 51(1), 19-24.

Kirschbaum, M. U. (2000). Forest growth and species distribution in a changing climate. *Tree physiology*, 20(5-6), 309-322.

Kolodny, N. H., Bauer, D., Bryce, K., Klucsevsek, K., Lane, A., Medeiros, L., & Wright, J. (2006). Effect of nitrogen source on cyanophycin synthesis in *Synechocystis* sp. strain PCC 6308. *Journal of bacteriology*, 188(3), 934-940.

Levitan, O., Rosenberg, G., Setlik, I., Setlikova, E., Grigel, J., Klepetar, J., ... & Berman-Frank, I. (2007). Elevated CO₂ enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Global Change Biology*, 13(2), 531-538.

Levitus, S., Antonov, J. I., Wang, J., Delworth, T. L., Dixon, K. W., & Broccoli, A. J. (2001). Anthropogenic warming of Earth's climate system. *Science*, 292(5515), 267-270.

Li, H., Sherman, D. M., Bao, S., & Sherman, L. A. (2001). Pattern of cyanophycin accumulation in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing cyanobacteria. *Archives of microbiology*, 176(1-2), 9-18.

Lindroth, A., Grelle, A., & Morén, A. S. (1998). Long-term measurements of boreal forest carbon balance reveal large temperature sensitivity. *Global Change Biology*, 4(4), 443-450.

Low-Décarie E., Fussmann, G. F., & Bell, G. (2011). The effect of elevated CO₂ on growth and competition in experimental phytoplankton communities. *Global Change Biology*, 17(8), 2525-2535.

Meeks, J. C., Wycoff, K. L., Chapman, J. S., & Enderlin, C. S. (1983). Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(4), 1351-1359.

Meeks, J. C. (1998). Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *BioScience*, 48(4), 266-276.

Meeks, J. C., & Elhai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 94-121.

Miller, R. W., & Eady, R. R. (1988). Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochem. J*, 256, 429-432.

Montesinos, M. L., Herrero, A., & Flores, E. (1995). Amino acid transport systems required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of bacteriology*, 177(11), 3150-3157.

Mulholland, M. R., Ohki, K., & Capone, D. G. (2001). Nutrient controls on nitrogen uptake and metabolism by natural populations and cultures of *Trichodesmium* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 37(6), 1001-1009.

Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2001). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38320-38328.

Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., Flores, E., & Herrero, A. (2002). Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Molecular microbiology*, 44(5), 1377-1385.

Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83(2), 135-150.

Nicholas, D. J. D., Nason, A., & McElroy, W. D. (1954a). Molybdenum and nitrate reductase I. Effect of molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 207(1), 341-352.

Nicholas, D. J. D., & Nason, A. (1954b). Molybdenum and nitrate reductase II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 207(1), 353-360.

Ochoa-Hueso, R., Paradela, C., Pérez-Corona, M. E., & Manrique, E. (2014). Pigment ratios of the Mediterranean bryophyte *Pleurochaete squarrosa* respond to simulated nitrogen deposition.

Ohashi, Y., Shi, W., Takatani, N., Aichi, M., Maeda, S. I., Watanabe, S., ... & Omata, T. (2011). Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *Journal of experimental Botany*, 62(4), 1411-1424. In *Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity* (pp. 207-216). Springer Netherlands.

Ouimet, R., & Duchesne, L. (2009). Dépôts atmosphériques dans les forêts au Québec: retombées actuelles en forêt et tendances au cours des 20 à 30 dernières années. *Naturaliste Canadien*, 133(1), 56-64.

Pan, Y., Birdsey, R. A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P. E., Kurz, W. A., ... & Ciais, P. (2011). A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science*, 333(6045), 988-993.

Pearce, J., Leach, C. K., & Carr, N. G. (1969). The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Journal of General Microbiology*, 55(3), 371-378.

Peterson, R. B., Dolan, E., Calvert, H. E., & Ke, B. (1981). Energy transfer from phycobiliproteins to photosystem I in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 634, 237-248.

Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J. M., Basile, I., ... & Delmotte, M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399(6735), 429-436.

Phoenix, G. K., Booth, R. E., Leake, J. R., Read, D. J., Grime, J. P., & Lee, J. A. (2003). Effects of enhanced nitrogen deposition and phosphorus limitation on nitrogen budgets of semi-natural grasslands. *Global Change Biology*, 9(9), 1309-1321.

Picossi, S., Valladares, A., Flores, E., & Herrero, A. (2004). Nitrogen-regulated genes for the metabolism of cyanophycin, a bacterial nitrogen reserve polymer. Expression and mutational analysis of two cyanophycin synthetase and cyanophycinase gene clusters in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11582-11592.

Rai, A. N., Söderbäck, E., & Bergman, B. (2000). Tansley Review No. 116. *New Phytologist*, 147(3), 449-481.

Rai, A. N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (2002). *Cyanobacteria in symbiosis*. In: Rai, A. N., Bergman, B., Rasmussen, U., eds. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Raupach, M. R., Marland, G., Ciais, P., Le Quéré, C., Canadell, J. G., Klepper, G., & Field, C. B. (2007). Global and regional drivers of accelerating CO₂ emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10288-10293.

- Rees, D. C., Tezcan, F. A., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., & Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1829), 971-984.
- Rishiram, R., Nadimuthu, V., Saravana Devi, S., Krishnamurthi, K., & Tapan, C. (2012). Influence of CO₂ concentration on carbon concentrating mechanisms in cyanobacteria and green algae: a proteomic approach. *Algae*, 27(4), 295-301.
- Romero, I. C., Klein, N. J., Sanudo-Wilhelmy, S. A., & Capone, D. G. (2013). Potential trace metal co-limitation controls on N₂ fixation and uptake in lakes with varying trophic status. *Frontiers in microbiology*, 4.
- Rousk, K., Jones, D. L., & DeLuca, T. H. (2013). Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Frontiers in microbiology*, 4.
- Rousk, K., Jones, D. L., & DeLuca, T. H. (2014). Exposure to nitrogen does not eliminate N₂ fixation in the feather moss *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. *Plant and soil*, 374(1-2), 513-521.
- Sartory, D. P., & Grobbelaar, J. U. (1984). Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, 114(3), 177-187.
- Sato, N., & Murata, N. (1980). Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: the central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 619(2), 353-366.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195(4275), 260-262.
- Schrautemeier, B., & Böhme, H. (1985). A distinct ferredoxin for nitrogen fixation isolated from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS letters*, 184(2), 304-308.
- Singh D. P. (2009). "Some secrets of ubiquity in cyanobacteria," in *Algal Biology and Biotechnology* eds Khattat J. I. S., Singh D. P., Kaur G., editors. (India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.) 57–62
- Smith, V. R. (1984). Effects of abiotic factors on acetylene reduction by cyanobacteria epiphytic on moss at a subantarctic island. *Applied and environmental microbiology*, 48(3), 594-600.

- Solanki, S. K., Usoskin, I. G., Kromer, B., Schüssler, M., & Beer, J. (2004). Unusual activity of the Sun during recent decades compared to the previous 11,000 years. *Nature*, *431*(7012), 1084-1087.
- Sprent, J. I., & Raven, J. A. (1985). Evolution of nitrogen-fixing symbioses. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, *85*(3-4), 215-237.
- Tel-Or, E., & Stewart, W. D. P. (1977). Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *198*(1130), 61-86.
- Thiel, T. (1993). Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Journal of bacteriology*, *175*(19), 6276-6286.
- Thiel T. (1999) Genetics and regulation of multiple nitrogenases in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. pp. 1-27. In: *Cyanobacterial and Algal Metabolism and Environmental Biotechnology*. Edited by T. Fatma. Phycological Society. India.
- Thiel, T. (2004). Genetic analysis of cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (pp. 581-611). Springer Netherlands.
- Thiel, T., Pratte, B. S., Zhong, J., Goodwin, L., Copeland, A., Lucas, S., ... & Woyke, T. (2014). Complete genome sequence of *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Standards in Genomic Sciences*, *9*(3), 562.
- Turetsky, M. R. (2003). The role of bryophytes in carbon and nitrogen cycling. *The Bryologist* *106*(3), 395-409.
- Turetsky, M. R., Mack, M. C., Hollingsworth, T. N., & Harden, J. W. (2010). The role of mosses in ecosystem succession and function in Alaska's boreal forest This article is one of a selection of papers from The Dynamics of Change in Alaska's Boreal Forests: Resilience and Vulnerability in Response to Climate Warming. *Canadian Journal of Forest Research*, *40*(7), 1237-1264.
- Vintila, S., & El-Shehawy, R. (2007). Ammonium ions inhibit nitrogen fixation but do not affect heterocyst frequency in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain AV1. *Microbiology*, *153*(11), 3704-3712.
- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur?. *Biogeochemistry*, *13*(2), 87-115.
- Vitousek, P. M., & Hobbie, S. (2000). Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. *Ecology*, *81*(9), 2366-2376.

- White, A., Cannell, M. G. R., & Friend, A. D. (2000). The high-latitude terrestrial carbon sink: a model analysis. *Global Change Biology*, 6(2), 227-245.
- Wolk, C. P. (1970). Aspects of the development of a blue-green alga. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 175(1), 641-647.
- Wolk, C. P., & Shaffer, P. W. (1976). Heterotrophic micro-and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Archives of microbiology*, 110(2-3), 145-147.
- Wolk, C. P., Ernst, A., & Elhai, J. (2004). Heterocyst metabolism and development. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 769-823). Springer Netherlands.
- Wu, C., Wang, Z., Sun, H., & Guo, S. (2006). Effects of different concentrations of nitrogen and phosphorus on chlorophyll biosynthesis, chlorophyll a fluorescence, and photosynthesis in *Larix olgensis* seedlings. *Frontiers of Forestry in China*, 1(2), 170-175.
- Wurzburger, N., Bellenger, J. P., Kraepiel, A. M., & Hedin, L. O. (2012). Molybdenum and phosphorus interact to constrain asymbiotic nitrogen fixation in tropical forests.
- Zackrisson, O., DeLuca, T. H., Nilsson, M. C., Sellstedt, A., & Berglund, L. M. (2004). Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology*, 85(12), 3327-3334.
- Zackrisson, O., DeLuca, T. H., Gentili, F., Sellstedt, A., & Jäderlund, A. (2009). Nitrogen fixation in mixed *Hylocomium splendens* moss communities. *Oecologia*, 160(2), 309-319.
- Zhang, Y., & Zhao, J. (2008). PII, the key regulator of nitrogen metabolism in the cyanobacteria. *Science in China Series C: Life Sciences*, 51(12), 1056-1065.
- Zhang, X., McRose, D. L., Darnajoux, R., Bellenger, J. P., Morel, F. M., & Kraepiel, A. M. (2016). Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications. *Biogeochemistry*, 127(2-3), 189-198.
- Zielke, M., Ekker, A. S., Olsen, R. A., Spjelkavik, S., & Solheim, B. (2002). The influence of abiotic factors on biological nitrogen fixation in different types of vegetation in the High Arctic, Svalbard. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 293-299.

