

LA CHLOROPHYLLE A FONCTIONNELLE DANS LES SUBSTRATS MEUBLES MARINS,  
 INDICE DE LA BIOMASSE DU MICROPHYTOBENTHOS.

*par*

Marie-Reine PLANTE-CUNY

*Station Marine d'Endoume, 13007 Marseille (France)*

SUMMARY

This paper reviews the main studies dealing with extraction methodology on chlorophyllian pigments on marine soft bottoms. From his own experience in a tropical environment, the author gives recommendations mainly about sampling and extraction. Special attention should be given to sandy bottoms, in which extracts are to be taken on a great thickness (several cm) and on several cores at the same spot.

INTRODUCTION

Le tri et les comptages de cellules, les estimations de volume et de masse des microphytes benthiques vivant à la surface et au sein des substrats meubles marins, sont rendus difficiles par la présence même des particules sédimentaires. C'est pourquoi bon nombre d'auteurs ont choisi d'extraire les pigments chlorophylliens et en particulier la chlorophylle *a*, pour en tirer une estimation indirecte de la biomasse spécifiquement végétale.

Certains chapitres spécialisés des manuels I.B.P. n°12 et 16 (WETZEL et WESTLAKE *in* VOLLENWEIDER 1969, ROUND et HICKMAN *in* HOLME et MC INTYRE 1971) résument et synthétisent les protocoles utilisés dans ce but par différents auteurs pour des végétaux macro- et microscopiques, vivant sur des substrats variés.

J'ai donné, pour ma part, une revue chronologique, analytique et critique, des différents travaux traitant depuis 1954 de l'extraction et des *mesures spectrophotométriques* des pigments chlorophylliens sur les *seuls substrats meubles marins ou lacustres* (PLANTE-CUNY 1974, complété *in* PLANTE-CUNY 1978). On constate que les techniques d'extraction et de séparation des divers pigments se sont améliorées. Une attention particulière est portée aux produits de dégradation de la chlorophylle *a* que l'on distingue de la "chlorophylle *a* fonctionnelle" ( acidification des extraits: WETZEL 1964;

LORENZEN 1967, MOSS 1967; chromatographie: TAYLOR et GEBELEIN 1964, DALEY et al. 1973 a et b). On note cependant que les problèmes d'*échantillonnage* sont rarement abordés (techniques de collecte des échantillons). Il me paraît absolument indispensable de porter à présent notre attention sur ce sujet.

### 1. *Echantillonnage:*

La récolte du sédiment devrait si possible être effectuée en plongée autonome (à pied pour les niveaux superficiels). Deux types de collecte devraient pouvoir être utilisés en parallèle pour des objectifs différents (sables et vases en milieu marin, PLANTE-CUNY 1974, 1978; en milieu lagunaire, PLANTE-CUNY 1977 a,b).

#### 1.1. Collecte par carottage:

Le carottage s'effectue à la main, le plus délicatement possible pour éviter la perturbation de l'interface eau-sédiment. Les carottiers sont des tubes en Plexiglas à bord d'attaque taillé en biseau ( $\emptyset$  intérieur 2,7cm soit 5,7 cm<sup>2</sup> de section, longueur 30cm); deux bouchons attachés au tube permettent la fermeture de la partie supérieure d'abord, puis de la partie inférieure. Les tubes bouchés sont maintenus verticalement, rassemblés dans un sac en plastique à la remontée. Les carottes sont congelées dès que possible.

Pour *l'étude de la répartition des pigments dans l'épaisseur du sédiment*, à partir d'une carotte congelée, on extraira les pigments sur des "tranches" de 0,5 ou 1 cm d'épaisseur par exemple.

Pour *l'étude de la répartition des pigments à la surface des sédiments* d'une station donnée, on utilisera plusieurs carottes géométriquement réparties sur le fond. On pourra en tirer des conclusions sur la micro-répartition des valeurs de concentrations pigmentaires, donc sur la signification des résultats obtenus par une seule, deux ou plusieurs carottes.

Ce type d'étude a montré que l'hétérogénéité de répartition des valeurs pigmentaires en surface, est souvent élevée (PLANTE-CUNY 1978). Cette hétérogénéité horizontale avait été soulignée par ODUM et al. (1958) dans les vases de quelques lagunes du Texas. Elle peut être attribuée à la répartition "en taches" ou "en voiles" des populations de microphytes, ou à la présence de terriers d'invertébrés par exemple. On a pu conclure (PLANTE-CUNY 1977 a,p.14) qu'une valeur de concentration en chlorophylle  $\alpha$ , estimée en mg.m<sup>-2</sup> à partir d'une seule carotte par station n'est pas réaliste.

L'échantillonnage idéal devrait donc être assez dense (une dizaine de carottes par station). Mais alors les manipulations et les mesures deviennent rapidement trop nombreuses.

C'est pourquoi j'ai utilisé aussi une deuxième technique de collecte permettant d'éviter les erreurs dues à la répartition en taches, à la présence de ripple marks ou aux bioturbations, tout en limitant le nombre des manipulations.

### 1.2. Collecte par écrémage:

Il s'agit de racler le sédiment sur une épaisseur limitée (0,5 cm environ), à l'aide d'une petite pelle coupante par exemple (5 cm de bord d'attaque environ) et de remplir sous l'eau un récipient à fermeture hermétique. Les coups de pelle sont donnés au hasard sur une surface de plusieurs m<sup>2</sup>. Ce mode de collecte est volontairement limité à la pellicule superficielle, la seule considérée comme "productive". Mais il intéresse une surface relativement importante. Cependant, l'expression des résultats est moins aisément rapportée à l'unité de surface; les sédiments étant égouttés et congelés le plus rapidement possible, l'extraction se fera sur un *poids* de sédiment humide connu. Les résultats s'expriment en microgrammes de pigments par gramme de sédiment sec ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ , sédiment séché après extraction).

Au laboratoire, une évaluation du poids spécifique (ou masse volumique) du sédiment égoutté, humide, permet de rapporter les concentrations pigmentaires à l'unité de surface, si nécessaire (PLANTE-CUNY 1978).

### 2 . Extraction des pigments, lectures spectrophotométriques, résultats:

Un exposé détaillé et critique de ces points a été donné (PLANTE-CUNY 1974): dimensions des échantillons, techniques d'extraction (broyage, pesées, solvants, réfrigération, centrifugation), lectures spectrophotométriques avant et après acidification.

Les formules utilisant les densités optiques d'extraits acétoniques, lues à 750 et 665 nm avant et après acidification, sont tirées de LORENZEN (1967) et adaptées ensuite au cas des sédiments. Le programme de calcul aboutit aux concentrations en chlorophylle *a* fonctionnelle (Chl.*a*) et en phéopigments (Phéo.) exprimées en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de sédiment sec et en  $\text{mg.m}^{-2}$  de sédiment en place.

On calcule aussi le rapport "Chl.*a*/Chl.*a* + Phéo." et éventuellement

le rapport "DO 430/DO 665" (MARGALEF 1960) qui indique, par simple lecture de deux densités optiques (DO), l'importance relative des quantités de caroténoïdes et de chlorophylle *c* par rapport aux quantités de chlorophylle *a* (la valeur de ce rapport est de 1,2 dans un extrait acétonique de chlorophylle *a* pure).

### 3 . *Discussion, recommandations:*

#### 3.1. Echantillonnage:

Dans le milieu marin néritique tropical que j'ai étudié (côte N-W de Madagascar), j'ai conclu à la nécessité de prélever dans une station, un nombre d'échantillons plus élevé sur les sables que sur les vases.

Dans tous les cas, on devrait effectuer des mesures en surface et dans l'épaisseur des sédiments; la couche riche en chlorophylle *a* est nettement plus épaisse sur les sables que sur les vases (plusieurs cm ou dizaines de cm).

Les échantillons doivent être congelés dès que possible (à bord des bateaux).

#### 3.2. Extraction par solvant:

Elle devra être effectuée sur les sédiments frais, égouttés mais non séchés à l'étuve ordinaire. Pour les vases à forte teneur en eau, le solvant doit être utilisé pur.

Les sables seront broyés. (L'opération est moins longue sur un sédiment vaseux). L'utilisation d'appareils à ultra-sons pour détruire les cellules est recommandée si possible.

#### 3.3. Spectrophotométrie et autres méthodes:

La méthode spectrophotométrique est souvent choisie car elle est utilisable dans de nombreux laboratoires. Les mesures au fluorimètre ne sont en général pas nécessaires dans le cas du microphytobenthos car les concentrations pigmentaires dans les extraits acétoniques obtenus avec quelques grammes de sédiment, sont en général suffisantes pour être évaluées au spectrophotomètre.

Des analyses fines de la chlorophylle *a*, de la phéophytine *a* et du phéophorbide *a*, sont obtenues par chromatographie et fluorimétrie (DALEY et al. 1973 a et b). Les pigments complémentaires (dits "accessoires") sont

très nombreux chez les algues variées constituant le microphytobenthos: diatomées, cyanophycées, phytoflagellés divers, chrysophycées, xanthophycées. L'analyse quantitative détaillée de ces pigments -biliprotéines (c-phycoyanine) -caroténoïdes (carotènes  $\alpha$  et  $\beta$ , flavacène, xanthophylles) -chlorophylle *c* - n'est pas obtenue à l'heure actuelle par des manipulations de routine.

#### 3.4. Utilisation des résultats:

Les résultats obtenus par la méthode spectrophotométrique sur la pellicule superficielle des sédiments peuvent donner une idée des possibilités de production primaire dans les stations considérées. On a observé des corrélations positives significatives entre production primaire (méthode du  $^{14}\text{C}$ ) et rapport  $\text{Chl.}\alpha / \text{Chl.}\alpha + \text{Pheo.}$ .

Il est cependant impossible, à partir des valeurs de concentrations en  $\text{Chl.}\alpha$  fonctionnelle, de calculer des taux de production primaire; celle-ci en effet dépend étroitement des conditions d'éclairement et probablement des concentrations en pigments complémentaires qui permettent la photosynthèse dans des conditions qualitatives d'éclairement très particulières, par exemple sous la surface des sédiments ou dans des stations profondes.

En conclusion, on pourra dire que les concentrations en chlorophylle  $\alpha$  fonctionnelle évaluées dans les substrats meubles, indices de la biomasse végétale, seront aussi un indice du potentiel photosynthétique disponible dans les associations algales qui constituent le microphytobenthos.

#### 4 . Bibliographie sommaire:

- DALEY R.J., GRAY C.B.J., BROWN S.R., 1973 a. A quantitative semiroutine method for determining algal and sedimentary chlorophyll derivatives. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 30 (3) : 345-356.
- DALEY R.J., GRAY C.B.J., BROWN S.R., 1973 b. Reversed-phase thin-layer chromatography of chlorophyll derivatives. *J. Chromatogr.*, 76:175-183.
- LORENZEN C.J., 1967. Determination of chlorophyll and Pheo-pigments:

- Spectrophotometric Equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12(2):343-346.
- MARGALEF R., 1960. Valeur indicatrice de la composition des pigments du phytoplancton sur la productivité, composition taxonomique et propriétés dynamiques des populations. *Rapp. Proc. Verb. C.I.E.S.M.M.*, 15(1):277-281.
- MOSS B., 1967. A note on the estimation of chlorophyll *a* in freshwater algal communities. *Limnol. Oceanogr.*, 12(2):340-342.
- ODUM H.T., MC CONNELL W. et ABBOTT W., 1958. The chlorophyll "A" of communities. *Publ. Inst. mar. Sci. Univ. Texas*, 5: 65-96.
- PLANTE-CUNY M.R., 1974. Evaluation par spectrophotométrie des teneurs en chlorophylle *a* fonctionnelle et en phéopigments des substrats meubles marins. *Doc. Sci. Mission O.R.S.T.O.M. Nosy-Bé*, n°45:1-76.
- 1975. Distribution selon la profondeur, de la chlorophylle *a* fonctionnelle et des phéopigments sur les sédiments de la lagune Ebrié (Abidjan). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 281 (18 D):1325-1328.
  - 1977 a. Pigments photosynthétiques et production primaire du microphytobenthos d'une lagune tropicale, la lagune Ebrié (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Océanogr.*, 15(1): 3-25.
  - 1977 b. Répartition à la surface et au sein du sédiment de la chlorophylle *a* et des phéopigments de quelques substrats meubles tropicaux immergés. *J. Rech. océanogr.*, 2 (2).
  - 1978. Pigments photosynthétiques et production primaire des fonds meubles néritiques d'une région tropicale (Nosy-Bé, Madagascar). Thèse multigraphiée, 233 p. (Université d'Aix-Marseille II) à paraître dans "Travaux et Documents" O.R.S.T.O.M.
- ROUND F.E. et HICKMAN M., 1971. Phyto-benthos sampling and estimation of primary production. pp.169-196, in: HOLME N.A. et MC INTYRE A.D. ed. *I.B.P. Handbook*, Blackwell, n° 16: Oxford and Edinburgh.
- TAYLOR W.R. et GEBELEIN C.D., 1964. Chromatography analyses of plant pigments in intertidal sediments. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, 127: 393.
- WETZEL R.G., 1964. A comparative study of the primary productivity of higher aquatic plants, periphyton, and phytoplankton in a large shallow lake. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 49 (1) :1-61.
- WETZEL R.G. et WESTLAKE D.F., 1969. Periphyton. pp.33-40, in: VOLLENWEIDER R.A. ed. *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. I.B.P. Handbook, Blackwell, n°12: Oxford and Edinburgh.