

Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Océanogr., vol. V, n° 1, 1967.

SUR L'IMPORTANCE RELATIVE DES CHLOROPHYLLES *a* ET *c* DANS LA COMPOSITION PIGMENTAIRE DU PHYTOPLANCTON EN ZONE TROPICALE OLIGOTROPHE

par Bruno WAUTHY* et Jacques LE BOURHIS*

ABSTRACT

*To investigate the possibility that high chlorophyll *c*/chlorophyll *a* ratio found in tropical waters may be an artefact brought about by the lack of sensitivity of the Richards-Thompson method, a station has been occupied near Noumea, New-Caledonia (22°40 S: 166°15 E): previously reported ratios from that location have always been high.*

Table I gives the sampling data: large volumes of water were filtered on HA Millipore filters with sufficient Mg CO₃ to allow particulate matter to be quantitatively swept off, so that no filter need be dissolved in the acetone.

*Table II presents the results by the method of RICHARDS-THOMPSON revised by PARSONS-STRICKLAND and also by the PARSONS method, specific for chlorophyll *c*.*

*Figure 1 shows that agreement between the two methods is quite good for the low values of the *c/a* ratio and that PARSONS's method gives lower values for the high ratios.*

*In Figure 2 are given the variations of chl *a*, chl *c* and chl *c*/chl *a* with depth. Ratios higher than unity seem to be found only well under the photosynthetic layer.*

*Recordings of absorption spectra of aqueous acetone extracts after separation from hexane in the PARSONS's method are presented in Figure 3. The (a) curves are supposed to be mainly for chlorophyll *c*; the (b) curves obtained after acidification should be for phaeophytin *c*. The relative disposition of the (a) and (b) curves expected is as for type 2, but this relation was found only for the 75 m sample. Type 1, found at all other depths is questionable. Studies on possible interfering compounds in PARSONS's method are urgently needed.*

*It is concluded that chl *c*/chl *a* ratios higher than unity found in the euphotic layer might well be due to the use of the RICHARDS-THOMPSON method below its sensitivity. Beneath the euphotic layer it looks as if the ratio was higher but this point needs to be established by very sensitive quantitative methods of separation of the two chlorophylls and of their derivatives.*

* Biologistes à l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre de Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

INTRODUCTION

Quand en 1962 HUMPHREY fit le bilan des résultats acquis dans l'Océan Pacifique en matière de pigments du phytoplancton, il apparut clairement que la chlorophylle *c* était quantitativement le pigment principal. Ce fait, entre autres, détermina une étude critique sérieuse de la méthode spectrophotométrique de RICHARDS-THOMPSON (1952) qui, plus ou moins modifiée, avait servi, dans l'enthousiasme général, à collecter pendant dix ans ces résultats suspects.

Cette étude critique a porté principalement sur les détails du mode opératoire et sur le fonds même de la méthode en montrant que les coefficients d'absorption spécifique utilisés étaient erronés, surtout ceux de la chlorophylle *c* (SCOR UNESCO, 1964 ; JEFFREY, 1963) ; nous disposons maintenant d'un nouveau mode opératoire et de formules révisées qui ont en effet pratiquement réduit de moitié les valeurs du rapport chlorophylle *c*/chlorophylle *a* trouvées au large ; mais il n'en reste pas moins que dans bien des cas elles excèdent encore de beaucoup celles fournies par des analyses sur cultures (PARSONS, 1961 ; HUMPHREY, 1963 ; MADGWICK, 1966), ou sur phytoplancton côtier.

Opérant dans une aire océanique particulièrement pauvre en phytoplancton, nous avons toujours été préoccupés par le manque de sensibilité d'une méthode conçue à l'origine pour des eaux plus riches. Ayant réussi à bord du *Coriolis* à augmenter la sensibilité de la méthode (WAUTHY et LE BOURHIS, sous presse) nous pensions que la plupart des rapports *c/a* plus grands que l'unité trouvés dans la couche euphotique en zone tropicale oligotrophe étaient dus à un mode opératoire inapplicable aux faibles concentrations.

En manière d'illustration de cette opinion, nous avons effectué des mesures à une station au large de Nouméa (166°15 E, 22°40 S), où les rapports *c/a* trouvés ont été jusqu'ici très élevés. Nous nous proposons d'augmenter la sensibilité en filtrant d'importantes quantités d'eau, de supprimer les inconvénients possibles d'un filtre Millipore dissous dans l'extrait acétonique, et de confronter les teneurs en chlorophylle *c* trouvées par cette méthode trichromatique d'une part et par la méthode de PARSONS (1963), spécifique de la chlorophylle *c* d'autre part.

MODE OPÉRATOIRE

Les détails concernant l'échantillonnage et les quantités d'eau filtrées sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

Date	Heure	Profondeur	Quantité
3/5/66	08 30	50 m	37 l
		100 m	70 l
		150 m	45 l
4/5/66	08 30	0 m	35 l
		25 m	40 l
		75 m	40 l
5/5/66	13 30	300 m	60 l
	08 30	500 m	100 l

TABLEAU II

Prof. m	RICHARDS-THOMPSON						PARSONS		
	chl <i>a</i> mg/m ₃	chl <i>b</i> mg/m ₃	chl <i>c</i> mg/m ₃	<i>b/a</i>	<i>c/a</i>	$\frac{D\ 430}{D\ 665}$	$\frac{D\ 750}{D\ 665}$	chl <i>c</i> mg/m ₃	<i>c/a</i>
0	0,065	0,012	0,056	0,18	0,86	5,8	0,10	0,050	0,77
25	0,068	0,007	0,040	0,10	0,59	5,0	0,02	0,039	0,57
50	0,185	0,036	0,073	0,19	0,39	3,3	0,03	0,078	0,42
75	0,160	0,024	0,056	0,15	0,35	3,3	0,03	0,039	0,24
100	0,086	0,009	0,033	0,10	0,39	3,2	0,02	0,036	0,42
150	0,050	0,030	0,033	0,60	0,66	5,5	0,03	0,029	0,58
300	0,023	0,009	0,026	0,39	1,13	6,5	0,03	0,018	0,78
500	0,005	0,004	0,012	0,80	2,40	8,6	0,35	0,008	1,60

La filtration a été réalisée à bord dans les trois heures qui suivaient le prélèvement, par fractions d'environ 10 litres par filtre Millipore HA. Une suspension de Mg CO₃ filtrée préalablement a permis de chasser, à l'aide d'un vaporisateur, les particules retenues sur chaque filtre et de les reprendre sur un seul filtre par profondeur échantillonnée. Les filtres ont été conservés à — 10° et à l'obscurité jusqu'au 18 mai. A cette date, le « gâteau » de Mg CO₃ retenant dans sa masse la matière particulée a été séparé de chaque filtre et extrait par 10 ml d'acétone à 90 % pendant une quinzaine d'heures. Les mesures spectrophotométriques ont été faites en parallèle sur un Beckman DB avec enregistreur en cuves de 4 cm et sur un Beckman DU en cuves de 10 cm. Les lectures au DU ont servi aux calculs suivant la méthode RICHARDS-THOMPSON (1952), révisée par PARSONS-STRICKLAND (1963), pour les chlorophylles *a* et *c* d'une part et PARSONS (1963) pour la chlorophylle *c* d'autre part.

RÉSULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau II ; les rapports chl *b*/chl *a*, D 430/D 665, D 750/D 665, n'y figurent qu'à titre indicatif. Les rapports chl *c*/chl *a* calculés à partir des valeurs de chlorophylle *c* obtenues par les deux méthodes ont été portés dans la figure 1. La figure 2 met en évidence les variations en fonction de la profondeur, de la chlorophylle *a* RICHARDS-THOMPSON, de la chlorophylle *c* PARSONS et de leur rapport. La figure 3 reproduit les deux types d'enregistrement au Beckman DB des spectres d'absorption de la solution acétonique après séparation d'avec l'hexane suivant la méthode PARSONS ; les courbes (a) sont les spectres avant traitement par HCl concentré, les courbes (b) sont les spectres après traitement ; le type 1 a été obtenu à toutes les profondeurs sauf 75 m qui a donné le type 2.

DISCUSSION

MÉTHODE RICHARDS-THOMPSON RÉVISÉE PAR PARSONS-STRICKLAND

Le fait de ne pas avoir de filtre Millipore dissous dans l'extrait acétonique a permis de minimiser l'importance des corrections de turbidité (D 750 retranchée à D 665, D 645 et D 630 ; 3 × D 750 retranchée à D 430) ; l'échantillon de surface pour lequel nous n'avons pu disposer que de l'enregistrement et l'échantillon profond qui nous a donné un trouble récalcitrant font exception. Nous avons filtré en moyenne 40 litres par profondeur, ce qui nous donne, pour le même volume d'extraction (10 ml) une sensibilité améliorée d'un facteur égal à huit, par rapport à la pratique courante (5 litres, cuves de 10 cm) et d'un facteur égal à cent par rapport au mode opératoire ancien (4 litres, cuves de 1 cm). Le résultat intéressant est que nous obtenons dans la couche 0-100 m une moyenne de 0,51 pour le rapport *c/a* ; les résultats tirés de l'I.G.Y. Report

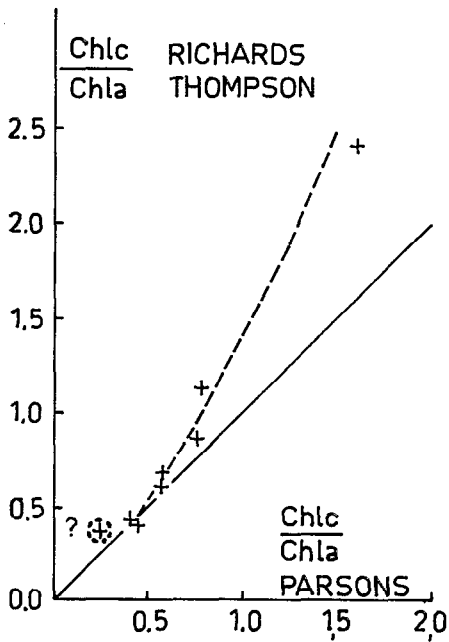


Figure: 1

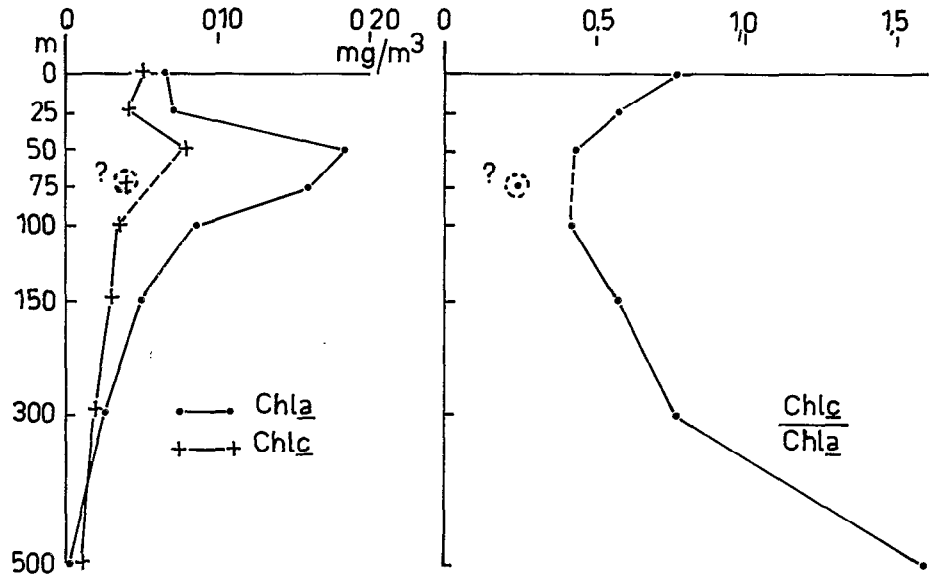


Figure: 2

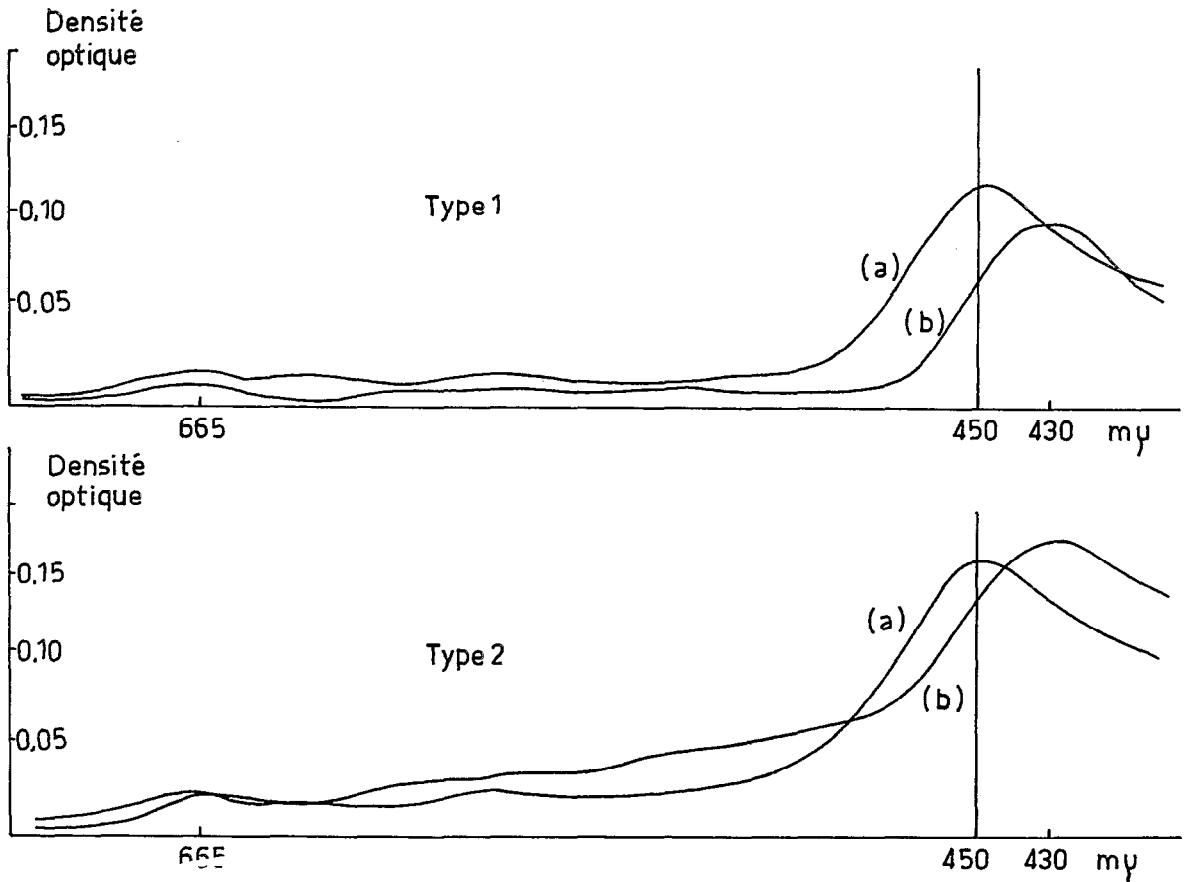


Figure:3

(DOTY et CAPURRO, 1961) concernant les stations occupées à proximité de Nouméa de 1958 à 1960 donnent dans cette même couche une moyenne de 4,6 pour les croisières australiennes et 6,7 pour les croisières françaises (valeurs trop élevées même si on les corrige de moitié pour tenir compte de la révision des formules). Par contre, les teneurs en chlorophylle *a* sont en accord avec les mesures australiennes.

MÉTHODE DE PARSONS

Les séparations entre solution acétonique aqueuse et hexane ont été faciles, l'absence de filtre dissous nous ayant même dispensé d'employer le Na Cl. Mais nous avons rencontré une anomalie déjà signalée par RICKETTS (1965) ; après acidification par H Cl concentré, le pic d'absorption de la solution acétonique s'est bien déplacé de 450 à 430 m μ mais nous avons enregistré une diminution de la hauteur de ce pic (type 1, figure 3) et ceci pour les échantillons 0, 25, 50, 100, 150, 300, 500 m ainsi que pour un fragment de Sargassum sp. sur lequel nous avons essayé la méthode. Par contre, l'échantillon 75 m nous a donné l'enregistrement type 2 (figure 3) qui seul, se rapproche des courbes présentées par PARSONS et de celles que l'on pourrait attendre de la transformation de la chlorophylle *c* en phaeophytine ; cet échantillon nous a d'ailleurs fourni le plus faible rapport *c/a*, soit 0,24, que l'on peut rapprocher de la même valeur citée par PARSONS pour la profondeur 50 m par 50° N, 145° W (PARSONS, 1963).

Il faudrait donc que puissent être rapidement étudiées les modalités d'emploi de la méthode, et précisés les critères par lesquels on pourrait juger de la légitimité de son utilisation sur un plancton donné ; la chromatographie pourrait nous renseigner sur les vraies valeurs du rapport *c/a* et sur les interférences possibles d'autres composés.

RAPPORT CHLOROPHYLLE *c*/CHLOROPHYLLE *a*

Sans sous-estimer les restrictions qui viennent d'être formulées, les résultats du tableau précédent portés sur la figure 1 montrent un excellent accord entre les deux méthodes, surtout pour les profondeurs les plus riches en pigments. Pour les teneurs plus faibles, la méthode trichromatique tend à donner des valeurs plus fortes que la méthode de PARSONS, comme les résultats de cet auteur l'ont montré et en opposition à ceux produits par RICKETTS (1965).

Cet accord entre les deux méthodes se fait sur des valeurs de *c/a* inférieures à l'unité pour toute la couche euphotique (0-150 m), la chlorophylle *c* ne semblant être quantitativement plus importante que la chlorophylle *a* qu'à des profondeurs élevées (figure 2). La diminution du rapport *c/a* de la surface jusqu'à la couche du maximum de pigments est à rapprocher des résultats déjà trouvés (WAUTHY et LE BOURHIS, sous presse) et pourrait être liée à l'influence du facteur lumière, bien que les proportions relatives de chl *a* et de phaeophytine *a*, inconnues à cette station, puissent atténuer cette diminution.

CONCLUSION

Ces mesures faites sur des échantillons de volume important, filtrés sur Millipore HA, mais en éliminant ces filtres avant extraction, donc dans des conditions de sensibilité accrue, malheureusement incompatibles avec un travail de routine, confirment l'hypothèse que les rapports chlorophylle *c*/chlorophylle *a* supérieurs à l'unité, trouvés dans la couche euphotique, pourraient n'être qu'un artefact du au manque de sensibilité d'une méthode valable pour des eaux eutrophes mais employée à mauvais escient en zone oligotrophe. Par contre, aux niveaux plus profonds où les quantités de matière phytale sont très faibles, il semblerait que les rapports *c/a* supérieurs à l'unité soient courants mais seules des méthodes quantitatives très sensibles de séparation des deux chlorophylles et de leurs produits de décomposition peuvent nous donner quelque assurance sur ce point.

BIBLIOGRAPHIE

- DOTY (M. S.) et (L. R. A.) CAPURRO, 1961. — Productivity measurements in the world ocean. Part. II (I.G.Y. Oceanography Report, Numb. 4).
- HUMPHREY (G. F.), 1962. — Phytoplankton pigments in the Pacific Ocean. Proc. Conf. on Primary Productivity Measurements, Marine and Freshwater, Univ. of Hawai. Aug. 21 sept. 6, 1961. (Ed. M. S. DOTY) (U.S. Atomic Energy Commission Monograph).
- HUMPHREY (G. F.), 1963. — Chlorophyll *a* and *c* in cultures of Marine algae. Aust. J. Mar. Freshw. Res., 14 : pp. 148-154.
- JEFFREY (S. W.), 1963. — Purification and properties of chlorophyll *c* from *Sargassum flavicans*. Biochem. J. 5., 86 : pp. 313-318.
- MADGWICK (J. C.), 1966. — Chromatographic determination of chlorophylls in algal cultures and phytoplankton. Deep Sea Res., vol. 13 : pp. 456-466.
- PARSONS (T. R.), 1961. — On the pigment composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada, 18 (6) : pp. 1017-1025.
- PARSONS (T. R.), 1963. — A new method for the micro-determination of chlorophyll *c* in sea water. J. Mar. Res., 21 (3) : pp. 164-171.
- PARSONS (T. R.), and STRICKLAND (J. D. H.) 1963. — Discussion of Spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. Mar. Res., 21 (3) : pp. 155-163.
- RICHARDS (F. A.) with (T. G.) THOMPSON, 1962. — The estimation and characterization of plankton populations by pigments analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. J. Mar. Res., 11 : pp. 156-172.
- RICKETTS (T. R.), 1965. — Chlorophyll *c* in some members of the chrysophyceae. Phytochemistry, 4 : pp. 725-730. Pergamon Press.
- SCOR-UNESCO, 1964. — Report of SCOR-UNESCO Working Group 17 on « Determination of Photosynthetic Pigments » (mimeo) Sydney.
- WAUTHY (B.) et LE BOURHIS (J.), 1966. — Considérations sur l'étude des pigments du phytoplancton marin en zone tropicale oligotrophe. Cah. ORSTOM sér. Océanogr. vol. IV, n° 4-pp. x-x.