

**Institut National des Sciences et Techniques de la Mer
CNAM - INTECHMER**

Promotion Roald Amundsen (1994-1996)

GENIE DE L'ENVIRONNEMENT MARIN

Rapport de stage de fin d'étude

Mesure de quelques paramètres environnementaux
du lagon de Papeete, Tahiti.
Adaptation des dosages de la chlorophylle *a*
et du phosphore organique particulaire

présenté par

Stéphanie Pourlier

Soutenu à Cherbourg le 10 septembre 1996

Centre ORSTOM de Tahiti, B.P. 529 - Papeete
Tahiti, Polynésie Française.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
PRESENTATION GENERALE.....	5
1 GENERALITES SUR LA POLYNESIE FRANÇAISE.....	5
1.1 Contexte géographique	5
1.2 Contexte climatique.....	5
1.3 Contexte économique	5
1.4 Caractéristiques du milieu côtier récifo-lagonaire	7
2 DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE.....	7
2.1 Objectif de l'étude	7
2.2 Définition de la chlorophylle	8
3 DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE PARTICULAIRE.....	9
3.1 Objectif de l'étude	9
3.2 Définition du phosphore.....	9
4 DENOMBREMENT BACTERIEN ET PRODUCTION BACTERIENNE	10
4.1 Objectif de l'étude	10
4.2 Définition (utilité écologique).....	10
5 MESURE DE LA SALINITE.....	10
5.1 Objectif de l'étude	10
5.2 Définition de la salinité.....	10
DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE	11
1 SITE D'ETUDE	11
2 PRELEVEMENT ET ECHANTILLONNAGE.....	11
2.1 Prélèvement.....	11
2.2 Filtration	13
2.3 Conservation des échantillons	13
3 DOMAINE D'APPLICATION.....	13
3.1 Calcul de la limite de détection (LD).....	13
3.2 Précision.....	13
4 MODE OPERATOIRE	13
5 PHASE ANALYTIQUE.....	14
5.1 Analyse spectrophotométrique	14
5.2 Analyse fluorimétrique et calibration du fluorimètre	15
5.3 Calcul, expression des résultats.....	15
6 MISE AU POINT METHODOLOGIQUE	16
6.1 Dans la colonne d'eau.....	16
6.2 Dans le sédiment	19
7 RESULTATS DES DOSAGES ANTROPIC.....	21
7.1 Colonne d'eau et matériel particulaire.....	21
7.2 Le sédiment.....	23
8 MISE AU POINT METHODOLOGIQUE POUR L'UTILISATION DES FILTRES MILLEX.....	24
8.1 Mode opératoire.....	24
8.2 Résultats méthodologiques.....	24
8.3 Test de durée de conservation des filtres Millex.....	25
8.4 Conclusion.....	27
9. CONCLUSION GENERALE.....	27

DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE PARTICULAIRE.....	28
1 PRINCIPE DE LA METHODE DE DOSAGE	28
2 MODE OPERATOIRE.....	28
2.1 Préparation du réactif oxydant.....	28
2.2 Préparation des échantillons.....	28
2.3 Dosage des ions orthophosphates.....	28
2.4 Préparation de la gamme étalon.....	29
2.5 Analyse spectrophotométrique.....	29
2.6 Calcul, expression des résultats.....	29
5 RESULTATS METHODOLOGIQUES.....	30
5.1 Expérience n°1.....	30
5.2 Expérience n°2.....	30
5.3 Expérience n°3.....	31
5.4 Expérience n°4.....	31
6 CONCLUSION.....	32
6.1 Blancs de filtre.....	32
6.2 Sensibilité de la méthode.....	32
6.3 Capacité analytique.....	33
DENOMBREMENT ET PRODUCTION BACTERIENNE.....	34
1 PRINCIPE DES METHODES.....	34
1.1 Dénombrement bactérien.....	34
1.2 Production bactérienne.....	34
2 DENOMBREMENT BACTERIEN.....	34
2.1 Prélèvement et échantillonnage.....	34
2.2 Matériels et méthodes.....	35
3 PRODUCTION BACTERIENNE DETERMINEE PAR INCORPORATION DE THYMININE.....	35
3.1 Prélèvement et échantillonnage.....	35
3.2 Mode opératoire.....	36
3.3 Calcul, expression des résultats.....	36
4 RESULTATS IN SITU.....	37
MESURE DE LA SALINITE.....	38
1 PRINCIPE DE LA METHODE DE MESURE.....	38
2 PRELEVEMENT ET ECHANTILLONNAGE.....	38
3 MODE OPERATOIRE.....	38
3.1 Etalonnage de l'appareil.....	38
3.2 Analyse des échantillons.....	38
3.3 Calcul de la salinité.....	38
4 RESULTATS DES MESURES SUR LES ECHANTILLONS ANTROPIC.....	39
CONCLUSION.....	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41
REMERCIEMENTS.....	43
ANNEXES.....	44

ICONOGRAPHIE

<u>Figure 1</u> : Carte générale de la Polynésie Française.	6
<u>Figure 2</u> : Coupe transversale schématique d'un complexe récifal d'île haute.	7
<u>Figure 3</u> : Spectres d'absorption d'une solution de chlorophylle a et d'une solution de chlorophylle b dans le méthanol. (Encyclopédie Universelle).	8
<u>Figure 4</u> : Schéma du cycle du phosphore dans les eaux de mer (Ivanoff, 1972).	10
<u>Figure 6</u> : Schéma du piège à particule.	11
<u>Figure 5</u> : Localisation des sites d'études (Port de Papeete).	12
<u>Tableau 1</u> : Comparaison des méthodes spectrophotométrique et fluorimétrique pour le dosage de la chlorophylle dans l'eau lagunaire, extraction au méthanol, (moyennes \pm écarts types).	16
<u>Tableau 2</u> : Comparaison des 2 solvants : méthanol et acétone à 90%, pour le dosage de la chlorophylle par fluorimétrie dans la colonne d'eau (moyennes \pm écarts types des duplicats). ..	17
<u>Figure 7</u> : Comparaison de 2 techniques d'agitation des extraits méthanoliques.	18
(moyennes et écarts types des triplicats).	18
<u>Figure 8</u> : Comportement de la chlorophylle a totale en fonction de la durée d'extraction dans le méthanol (moyennes et écarts types des duplicats).	19
<u>Figure 9</u> : Comparaison des deux techniques : spectrophotométrie et fluorimétrie (carotte B).	20
<u>Figure 10</u> : Evolution de la chlorophylle a totale en fonction de la profondeur (carotte B). Comparaison des deux solvants d'extraction : acétone + ultra-sons et méthanol sans ultra-sons (moyennes et écarts types des triplicats).	20
<u>Figure 11</u> : Répartition de la chlorophylle a totale dans la colonne d'eau et du pourcentage de la chlorophylle a active (moyennes et écarts types des mois d'octobre 95 à juin 96 sans le mois de mars 96).	21
<u>Figure 12</u> : Répartition de la chlorophylle a totale dans le matériel particulaire (moyennes et écarts types des mois d'octobre 95 à juin 96 sans le mois de mars 96).	22
<u>Figure 13</u> : Répartition de la chlorophylle a totale dans le matériel particulaire pour le mois de septembre 95 (moyennes et écarts types des triplicats).	22
<u>Figure 14</u> : Evolution de la chlorophylle a totale et du % de chlorophylle a active dans la carotte B (moyennes et écarts types des triplicats).	23
<u>Tableau 3</u> : Influence de la durée d'extraction de la chlorophylle pour les filtres Millex et comparaison avec la procédure classique (Whatman GF/F)	24
<u>Tableau 4</u> : Test de comparaison des filtres GF/F et Millex.	25
<u>Figure 15</u> : Test de conservation des filtres Millex à température ambiante (1 ^{ère} expérience).	26
<u>Figure 16</u> : Test de conservation des Millex au froid (+4°C) et à température ambiante (+28°C) (2 ^{ème} expérience).	26
<u>Tableau 5</u> : Phosphore organique particulaire en station 23 (2 juillet 96) (expérience n°1).	30
<u>Tableau 6</u> : Phosphore organique particulaire en station 23 (4 juillet 96) (expérience n°2)	30
<u>Tableau 7</u> : Phosphore organique particulaire en station 23 (9 juillet 96) (expérience n°3).	31
<u>Tableau 8</u> : Phosphore organique particulaire (ponton Arue, 19 juillet 96) (expérience n°4).	32
<u>Figure 17</u> : Temps de génération, production et abondance bactérienne pour le mois d'avril 96 sur les 23 stations Antropic.	37
<u>Figure 18</u> : Répartition de la salinité (moyenne de novembre 95 à juillet 96 et écarts types).	39

INTRODUCTION

Dans le cadre de la formation suivie à l'Institut National des Sciences et Techniques de la Mer (INTECHMER) à Cherbourg, j'ai effectué un stage de fin d'étude d'avril à août 1996 au Centre de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) de Tahiti (Polynésie Française), au sein de l'équipe du programme ANTROPIC et du Programme Général de Recherche sur la Nacre (PGRN-2).

Le programme ANTROPIC étudie les impacts anthropiques sur le lagon de Papeete. Il vise à identifier les relations entre les modifications des conditions du milieu provoquées par l'activité humaine et l'évolution des peuplements lagunaires. Ce programme s'intéresse particulièrement aux phénomènes d'eutrophisation et d'hypersédimentation qui ont été observés dans le lagon de Tahiti, aux abords de Papeete et qui sont, aujourd'hui, reconnus comme les principales sources d'altération du milieu corallien.

Le PGRN-2 s'intéresse aux connaissances générales relatives à la perliculture, dont le Territoire de Polynésie Française espère le développement. 15 actions de recherche couvrent tant le milieu naturel (les atolls) que la physiologie de la nacre (*Pinctada margaritifera*). Une de ces actions consiste à mettre en place un suivi constant et régulier des paramètres du milieu, notamment de la chlorophylle.

Dans le cadre de cette action, il m'a été confié une mise au point méthodologique sur l'utilisation d'unités de filtration Millex pour le dosage de la chlorophylle. Ces filtres n'ayant jamais été utilisés pour ce type d'analyse, il m'a été demandé de réaliser une étude de faisabilité, notamment des tests sur leur durée de conservation dans les conditions existantes dans les îles.

Dans le cadre du programme ANTROPIC, les objectifs de ce stage étaient multiples :

- vérifier si les méthodes de dosage de la chlorophylle utilisées au centre étaient les mieux adaptées dans 3 compartiments différents (colonne d'eau, matériel particulaire et sédiment), en effectuant une mise au point méthodologique.
- effectuer des dosages de chlorophylle en routine dans ces trois compartiments.
- mettre au point une méthode de dosage du phosphore organique particulaire, ce dosage n'ayant pas encore été effectué au centre.
- apprendre à effectuer des dénombrements bactériens ainsi que des mesures de production bactérienne.
- et effectuer des mesures de salinité.

Ce stage a comporté une partie bibliographique afin de cerner au mieux les problèmes posés, une partie de terrain (prélèvements et observations) et une importante partie au laboratoire.

PRESENTATION GENERALE

1 Généralités sur la Polynésie Française

La présentation de la Polynésie qui suit, a été choisie afin que le lecteur puisse avoir en mémoire quelques notions géomorphologiques de ce Territoire que ses habitants ont longtemps appelé « Te pito te fenua » (le nombril de la terre).

1.1 Contexte géographique

La Polynésie Française s'étend de 134°W à 155°W et de 8°S à 28°S (figure 1). Les terres émergées ne représentent que 4000 km², réparties sur 4 000 000 km² d'océans, et se regroupent en 118 îles. Ce Territoire se divise en cinq archipels séparés par de vastes étendues océaniques.

On distingue :

- *l'archipel des Tuamotu*, qui s'étend sur 800 km². Il est composé de 76 terres émergées sous forme d'atolls.
- *l'archipel des Gambiers*, qui prolonge le précédent et est de même nature.
- *l'archipel des Marquises*, formé de 14 îles n'ayant aucune protection récifale.
- *l'archipel des Australes*, composé de 5 petites îles de faible altitude.
- et de *l'archipel de la Société* qui regroupe 5 îles du Vent dont Tahiti et Mooréa et 9 îles Sous le Vent. Il est aussi bien constitué d'îles hautes que d'atolls.

L'île de Tahiti, où a été réalisée l'étude, est la plus grande des îles Polynésiennes (1042 km²). Elle se retrouve dans le gyre du Pacifique Sud central. Les eaux, de caractères océaniques, sont très oligotrophes (concentration en Chlorophylle $a < 0.3 \text{ mg/m}^3$, d'après Pujon-Pay, 1995).

1.2 Contexte climatique

Tahiti est soumise à un climat tropical océanique chaud et humide : la température moyenne varie de 25 à 28 °C et l'humidité relative de 70 à 90%. On distingue une saison des pluies de décembre à mars (été austral chaud et pluvieux) et une saison sèche de mai à août (hiver austral frais et sec).

Le régime des vents est simple. Les alizés d'Est, prédominent toute l'année, oscillant entre les secteurs NE en été et SE en hiver (Atlas de la Polynésie Française, 1993).

1.3 Contexte économique

La Polynésie Française est peuplée de 166 753 habitants (dont 115 820 pour Tahiti, d'après le recensement de 1983 (Atlas de la Polynésie Française, 1993). Une accélération du phénomène de concentration de la population a été observée dans les années 1970 dans la ville de Papeete. L'arrivée de 15 000 personnes pour l'implantation du CEP (Centre d'Expérimentation du Pacifique), les changements économiques et sociaux et les importants travaux dus à la construction du port et de l'aéroport international ont provoqué une explosion de la zone urbaine.

Comme de nombreux pays insulaires de la ceinture tropicale du Pacifique soumis à un développement économique rapide et souvent mal contrôlé, Tahiti n'est pas équipé de système d'assainissement et de traitement des déchets (stockage des déchets non traités en fond de vallée, rejets directs des eaux usées). Les effluents sont collectés et rejetés par les eaux de ruissellement dans le lagon.

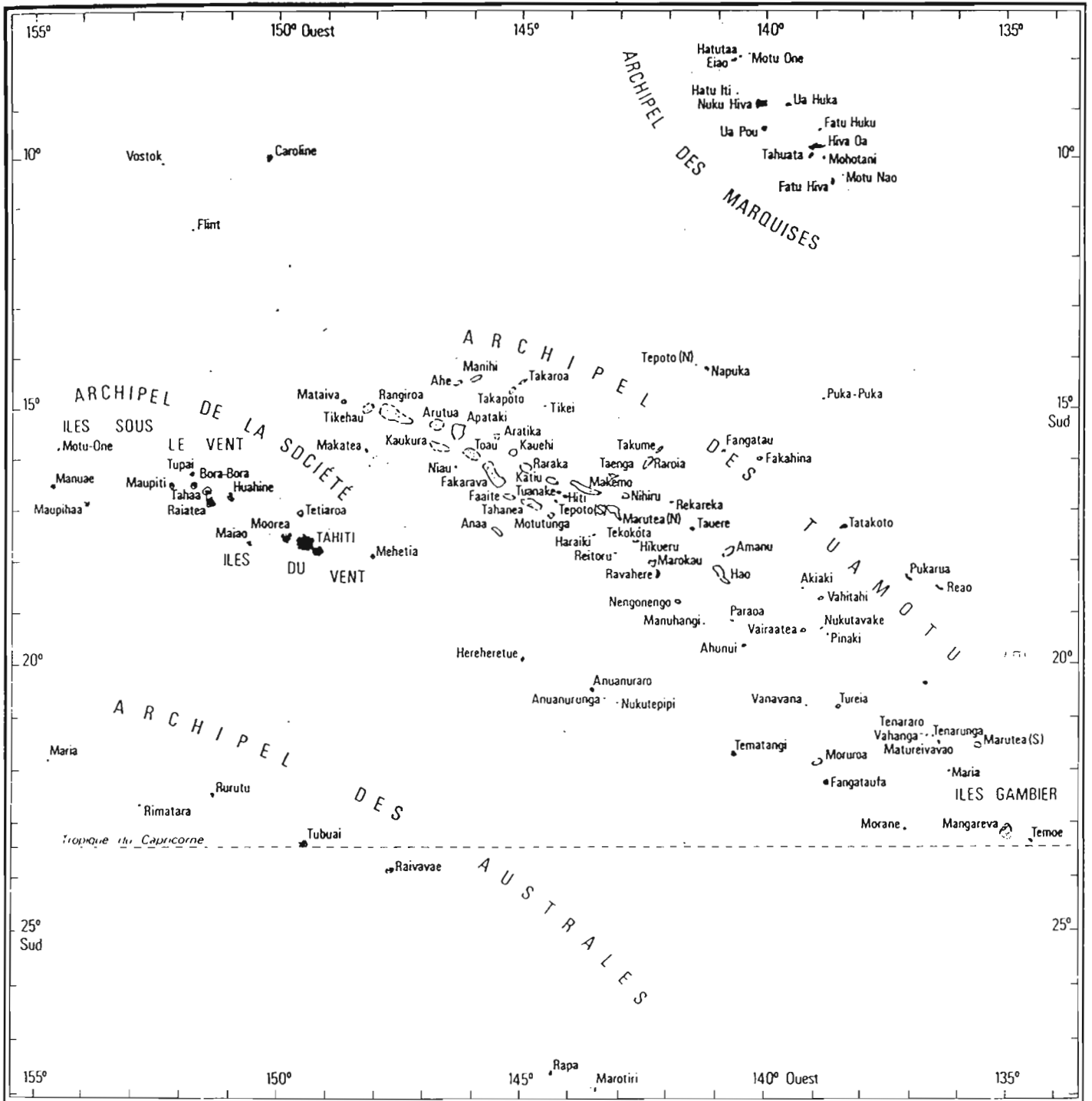


Figure 1 : Carte générale de la Polynésie Française.

1.4 Caractéristiques du milieu côtier récifo-lagonaire

Le complexe récifal se compose du rivage vers l'océan (figure 2)

- d'un récif frangeant, à faible profondeur.
- d'un chenal plus ou moins profond, débouchant sur des passes aux abords desquelles le courant est élevé.
- d'un récif barrière, constitué d'un platier récifal peu profond (2 à 3 m d'eau), d'une crête externe et au delà du front récifal d'une pente externe abrupte.
- et de passes permettant la décharge des eaux lagunaires vers l'océan.

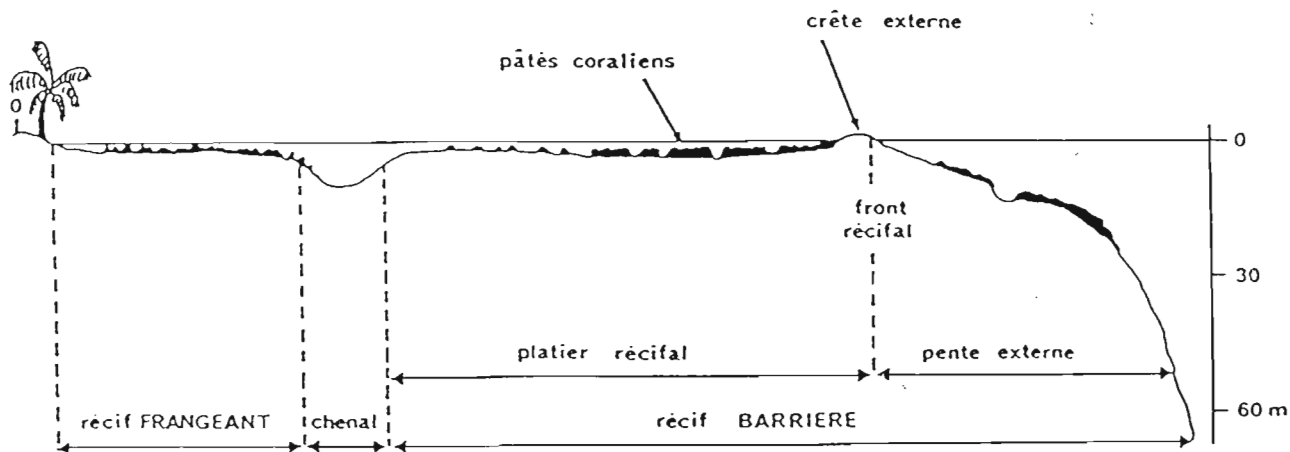


Figure 2 : Coupe transversale schématique d'un complexe récifal d'île haute.

Le milieu lagonaire joue un rôle tampon entre les terres émergées de l'île et l'océan. L'alimentation du lagon se fait par 2 sources bien distinctes :

- une source océanique, s'effectuant par le déferlement des vagues sur la crête externe du récif barrière,
- une source terrestre, provenant des eaux de ruissellements de l'île sous l'effet des précipitations.

Les caractéristiques physico-chimiques des eaux lagunaires varient donc en fonction de ces deux sources et du temps de résidence des eaux.

2 Dosage de la chlorophylle

2.1 Objectif de l'étude

2.1.1 Premier objectif

Le but a été d'effectuer une étude expérimentale concernant certains points du protocole afin de vérifier si les méthodes utilisées au centre étaient les plus adaptées. Il s'agissait de comparer deux techniques différentes (fluorimétrie et spectrophotométrie) ainsi que l'utilisation de deux solvants d'extraction différents (le méthanol à 100% et l'acétone à 90%), afin de déterminer la méthode la mieux adaptée aux sites étudiés (eau lagonaire, matériel particulaire et sédiment). Par la suite des mesures de routine de la chlorophylle dans ces trois compartiments ont été menées dans le cadre du programme ANTROPIC (fiche descriptive en Annexe 1).

2.1.2 Second objectif

Nous avons pour but d'étudier si l'utilisation d'unités de filtration Millex était envisageable dans le cadre du dosage de la chlorophylle. Ces filtres n'ayant jamais été utilisés pour ce type d'analyse, nous avons étudié leur mise en oeuvre et notamment leur mode de conservation en

s'inspirant du protocole suggéré par Dandonneau (1982), et en vérifiant que ce protocole soit applicable dans les conditions prévues par le PGRN-2.

Les suivis prévus par le PGRN-2 doivent être effectués par les periculteurs eux-mêmes sur les atolls en collectant chaque semaine une série de mesures, d'observations et d'échantillons qui permettra une description quantifiée de l'évolution du milieu naturel.

Il est évident que les capacités des observateurs (connaissances, expériences et disponibilités) doivent être prises en compte pour définir la nature des descripteurs ainsi que des protocoles. Les conditions matérielles locales, souvent rustiques, doivent aussi être considérées.

Dans le cas précis du dosage de chlorophylle, nous devons respecter un ensemble de contraintes :

- prélèvement peu complexe :
 - manipulations réduites au minimum,
 - pas de mesure de volume par visée.
- conservation de l'échantillon :
 - pas de « chaîne de froid » disponible,
 - isolement géographique.

Dandonneau (1982) montre que la fluorescence des échantillons (filtres Wathman GF/F conservés à l'obscurité et au sec) diminue avec le temps de façon drastique les 3-4 premiers jours puis se stabilise au bout de 20 à 30 jours de conservation. Un taux de dégradation de la chlorophylle en fonction du temps en est alors déduit. On peut ainsi estimer la teneur initiale de nos échantillons au moment du prélèvement.

Mon rôle a donc été d'étudier la conservation de la chlorophylle collectée sur des unités de filtration Millex dans différentes conditions. Ces expériences ont été effectuées sur des prélèvements d'eau du lagon de Tahiti.

2.2 Définition de la chlorophylle

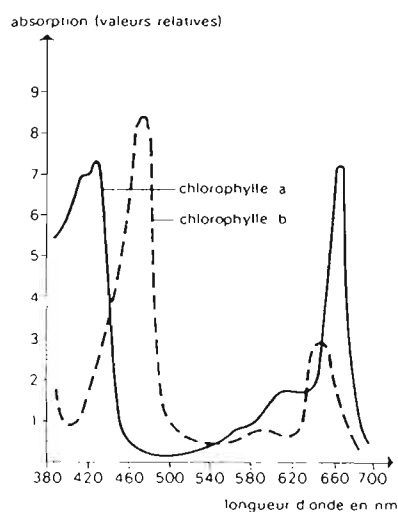
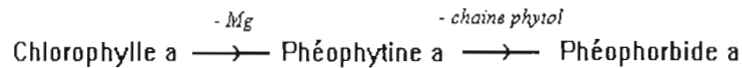


Figure 3. Spectres d'absorption d'une solution de chlorophylle a et d'une solution de chlorophylle b dans le méthanol. (Encyclopédie Universelle).

Les chlorophylles sont les pigments verts des végétaux capables de photosynthèse. Le pigment principal est la chlorophylle *a*, présente dans les chloroplastes des cellules de tous les végétaux de couleur verte : plantes à fleurs, fougères, mousses, algues vertes. Les différentes chlorophylles (*a*, *b*, *c*, *d* et *e*) ont une structure chimique semblable, toutes comprennent un métal, le magnésium. Elles ne diffèrent entre elles que par de petits détails de structure moléculaire, ainsi, la chlorophylle *b* possède un groupement -CHO sur le noyau pyrrole à la place d'un groupement -CH₃ pour la chlorophylle *a*. Ces faibles différences structurales entraînent d'importantes différences dans les spectres d'absorption de la lumière (figure 3).

La richesse des molécules de chlorophylle en doubles liaisons conjuguées entre les atomes de carbone et d'azote (=C-C= ou =C-N=) leur communique une intense coloration. En solution dans l'éther, l'acétone ou le méthanol, la chlorophylle *a* est bleu-vert, alors que la chlorophylle *b* est vert-jaune.

Pour la chlorophylle *a*, Yentsch (1967) résume la dégradation selon le schéma :



L'acidification entraîne l'élimination de l'atome de magnésium et de la chaîne phytol. Nous regrouperons dans la suite de ce rapport, les produits de dégradation de la chlorophylle sous le nom de phéopigment.

La concentration de la chlorophylle *a* en tant qu'estimation de la biomasse du phytoplancton, est un bon indicateur de l'état d'eutrophisation du milieu étudié.

D'après Neveux *et al* (1990), les concentrations en chlorophylles *a* et en phéopigments *a* totaux peuvent être déterminées par cinq méthodes différentes, faisant appel à trois techniques différentes :

- la spectrophotométrie (équations trichromatiques),
- la spectrophotométrie (équations monochromatiques de Lorenzen),
- la fluorimétrie,
- la spectrofluorimétrie,
- la chromatographie liquide à haute performance.

Une nouvelle approche est à l'étude avec un dosage de pigment sur l'eau brut (Vyhnalek, 1994).

Les méthodes classiques sont la spectrophotométrie et la fluorimétrie, méthodes sur lesquelles nous avons travaillé. Le principal intérêt de la méthode fluorimétrique par rapport à la méthode spectrophotométrique est sa plus grande sensibilité.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange (grâce à sa colonne de séparation) pour ensuite permettre leur identification par fluorimétrie ou spectrophotométrie. L'HPLC reste une technique de dosage pointue nécessitant un matériel onéreux et un personnel spécialisé.

3 Dosage du phosphore organique particulaire

3.1 Objectif de l'étude

Le but de cette seconde partie de stage a été de mettre au point un protocole de dosage du phosphore organique particulaire (POP) applicable au centre ORSTOM de Papeete et adapté aux échantillons d'eau lagonaire. Ce type de dosage n'ayant jamais été effectué auparavant dans ce centre, il est important de vérifier son bon fonctionnement et la fiabilité des résultats obtenus pour d'éventuelles mesures de routine.

3.2 Définition du phosphore

Le phosphore est un élément nutritif qui apparaît sous formes de divers composés organiques en suspension ou en solution, sous forme de phosphates inorganiques insolubles ou adsorbés par les particules en suspension, sous forme enfin, et surtout de phosphates inorganiques solubles, à savoir principalement des ions HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} . Leurs dosages, effectués avant et après filtration, permettent d'estimer les proportions des quatre formes de phosphore : phosphore organique dissous, phosphore inorganique dissous, phosphore organique particulaire et phosphore inorganique particulaire (ou adsorbé).

De même que les ions ammonium, nitrite et nitrate, le phosphore inorganique est assimilé par les organismes photosynthétiques et utilisé pour la synthèse de la matière organique (figure 4), servant principalement de nourriture au zooplancton et aux autres animaux marins. Le phosphore organique repasse à l'état naturel soit sous l'action d'enzymes sécrétées par les cellules végétales (phosphatases) ou par l'appareil digestif des animaux ou soit par les bactéries (Ivanoff, 1972).

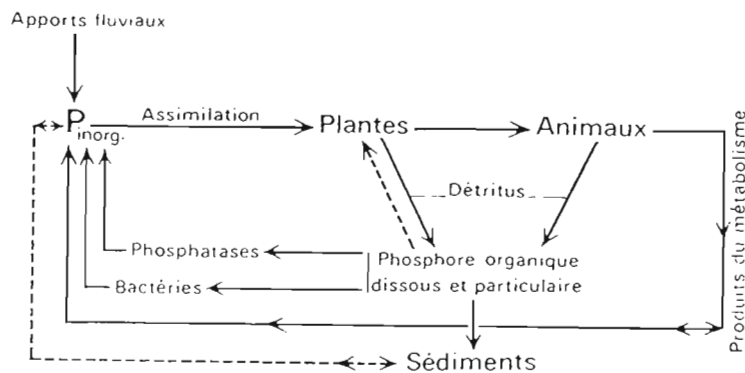


Figure 4 : Schéma du cycle du phosphore dans les eaux de mer (Ivanoff, 1972).

Les teneurs en phosphates sont normalement assez faibles en surface en milieu océanique et côtier non pollué : 0 à 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Dans les estuaires, des concentrations très élevées peuvent être atteintes : plusieurs dizaines de micromoles par litre selon la salinité. Ces fortes concentrations, indice d'un enrichissement d'origine domestique et agricole, sont considérées comme à l'origine du phénomène d'eutrophisation (Aminot et Chaussepied, 1983).

4 Dénombrement bactérien et production bactérienne

4.1 Objectif de l'étude

Le but de cette troisième partie de stage a été de se familiariser d'une part à la technique du microscope à épifluorescence en effectuant notamment des comptages bactériens (bactéries totales, cyanobactéries, flagellés autotrophes et hétérotrophes, bactéries fixées et particules), et d'autre part à la méthode de détermination de la production bactérienne par incorporation de thymidine.

4.2 Définition (utilité écologique)

Les micro-organismes sont utilisés en tant que bio-indicateurs de l'état d'eutrophisation du milieu récifo-lagonaire, ce qui fournit un outil de diagnostic de l'état de l'environnement.

Les bactéries constituent un élément important des écosystèmes à double titre. D'une part, parce qu'elles assurent une part prédominante de la minéralisation de la matière organique inutilisée (ceci ne concerne que les bactéries hétérotrophes) et d'autre part parce qu'elles constituent un réservoir nutritif (Jacques et Tréguer, 1986).

5 Mesure de la salinité

5.1 Objectif de l'étude

Le but de cette dernière partie de stage a été de se familiariser au principe et à la technique du salinomètre à induction en effectuant notamment des mesures de salinité sur des échantillons ANTROPIC.

5.2 Définition de la salinité

La salinité (ou la teneur en sel dissous de l'eau) a une influence importante sur la densité de l'eau de mer. De façon générale, elle permet de connaître la circulation océanique, d'identifier les masses d'eaux d'origines différentes et de suivre leurs mélanges à la côte, dans les estuaires et en milieu polaire au niveau de la fonte des glaces.

DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE

1 Site d'étude

La zone géographique la plus sensible aux perturbations terrigènes et anthropiques se situe aux abords de la ville de Papeete. Le programme ANTROPIC étudie la zone qui s'étend de la passe de Papeete à la Passe de Pomare (figure 5). Trois compartiments y sont étudiés :

- la colonne d'eau (23 stations dont une référence océanique),
- le matériel particulaire (6 stations),
- le sédiment (4 stations).

2 Prélèvement et échantillonnage

2.1 Prélèvement

L'eau est prélevée en sub-surface (-1 m) à l'aide d'une bouteille Niskin, transvasée dans des bidons en polyéthylène de 5 litres, puis stockée à l'obscurité et à température ambiante dans des glacières jusqu'aux analyses moins de 2 heures après le prélèvement. La bouteille et les bidons sont préalablement lavés à l'HCl 10% et rincés abondamment avec l'eau du prélèvement.

Le matériel particulaire en voie de sédimentation est collecté à l'aide de pièges à particules. Ces pièges (figure 6) sont constitués d'un ensemble de trois cylindres en PVC, de 45 cm de long et de 8 cm de diamètre. L'ensemble est placé verticalement à 1 mètre du fond pendant 48 heures environ.

Le sédiment est prélevé à l'aide d'un carottier tube en PVC de 1 mètre de long et de 20 cm de diamètre. Ce tube est enfoncé dans le sédiment à l'aide d'une masse à une profondeur d'environ 70 cm. Le carottier est dégagé à l'aide d'une suceuse, bouché à sa partie inférieure et remonté à la surface à l'aide d'un parachute.

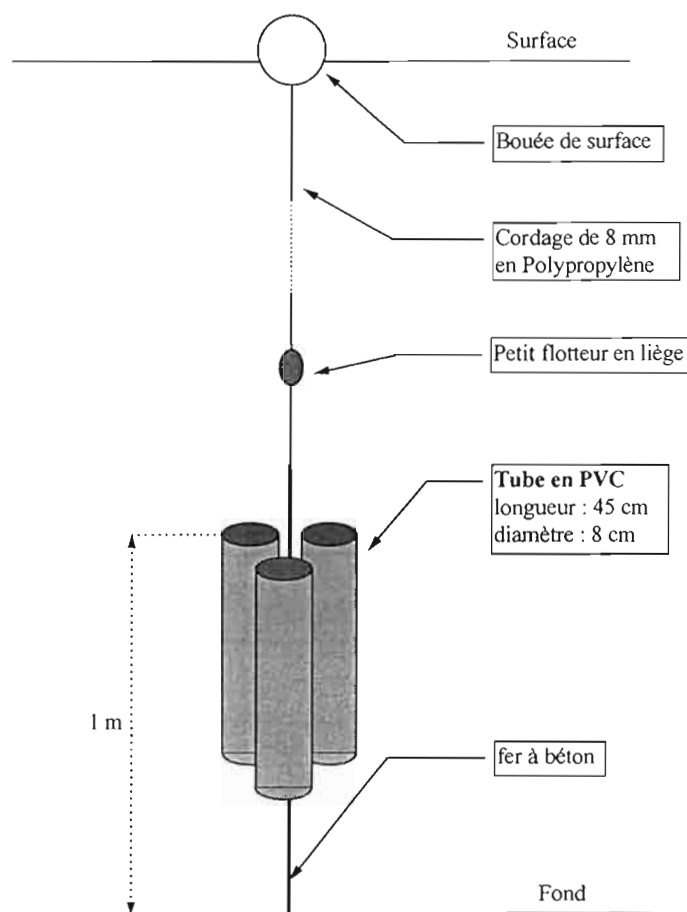


Figure 6 : Schéma du piège à particule.

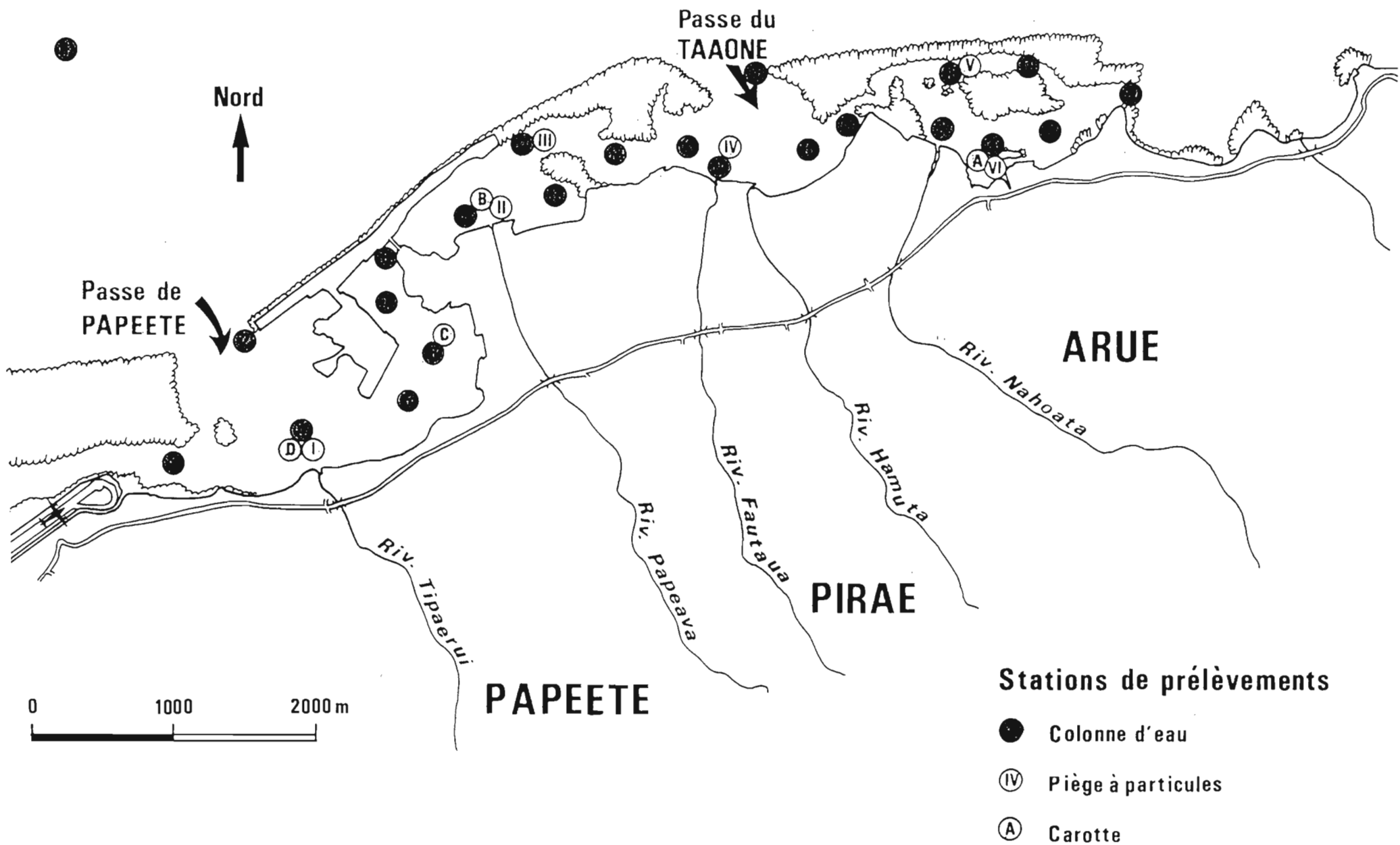


Figure 5 : Localisation des sites d'études (Port de Papeete)

2.2 Filtration

Les échantillons d'eau et de matériel particulaire sont agités et filtrés dès leur arrivée au laboratoire.

2.2.1 Filtration de l'eau

L'eau est filtrée sur des membranes en fibres de verre de type Whatman GF/F (0,7 μm de porosité) de 25 mm de diamètre à l'aide d'un banc de filtration constitué d'un entonnoir et d'un fritté en verre ainsi que d'une pince de serrage en métal. Le vide n'excède pas 38 cm de Hg afin de ne pas éclater les cellules. Le volume d'eau filtrée dépend de la charge en particule de l'échantillon. Il faut essayer de filtrer le maximum d'eau en évitant de colmater le filtre.

2.2.2 Filtration du matériel particulaire

Le contenu du piège à particule (volume V_1) est versé dans un bécher. Le piège est rincé avec de l'eau de mer filtrée, on obtient un volume (V_2). Le contenu de ce bécher, maintenu homogène à l'aide d'un agitateur magnétique et d'un barreau aimanté, est ensuite filtré, de la même façon que l'eau de mer, sur des filtres Whatman GF/F de 25 mm de diamètre.

2.3 Conservation des échantillons

Après la filtration de l'eau et du matériel particulaire, tous les filtres Whatman GF/F sont pliés dans des microtubes et sont conservés à l'abri de la lumière à -20°C , avant d'être analysés.

Les carottes de sédiments sont découpées en tranches de 1 cm et sont conservées à -20°C .

3 Domaine d'application

3.1 Calcul de la limite de détection (LD)

Avec un fluorimètre Turner modèle 111, la limite de détection est d'environ 1 à 3 $\mu\text{g chl } a.l^{-1}$ dans l'extrait acétonique (Aminot et Chaussepied, 1983). Ceci correspond à une LD de **0,023 à 0,07 $\mu\text{g chl } a.l^{-1}$ d'eau de mer filtrée** pour nos conditions de mesures (7 ml de solvant et 300 ml d'eau de mer filtrée).

De la même manière, pour la spectrophotométrie, la limite de détection est de **0,11 $\mu\text{g chl } a.l^{-1}$ d'eau de mer filtrée** dans nos conditions de mesures (7 ml de solvant d'extraction, 3 litres d'eau de mer filtrée et 4 cm de trajet optique).

3.2 Précision

Pour la fluorimétrie, Aminot et Chaussepied (1983) considèrent que la méthode est précise à **15 %** avec un appareillage identique au nôtre.

Pour la spectrophotométrie, les mêmes auteurs donnent une précision de \pm **5 %** au niveau de 5 μg de chlorophylle (soit \pm 0,25 μg).

La plupart de nos dosages ont été effectués en duplicat afin de calculer la moyenne et l'écart type. Cet écart type (σ) donne une estimation de la reproductibilité de la mesure, et des éventuelles erreurs dues au manipulateur et à l'appareillage (si l'échantillon est homogène).

4 Mode opératoire

Pour l'extraction des pigments chlorophylliens, dans la colonne d'eau ou le matériel particulaire, les filtres sont placés dans des tubes en polystyrène contenant 7 ml de solvant d'extraction. Les échantillons de sédiment (environ 2 ml) reçoivent, eux, 8 ml de solvant. Deux types de solvants sont utilisés : le méthanol à 100% et l'acétone à 90%. Les tubes sont bouchés, agités

fortement puis placés à l'obscurité à une température de 5 °C pour une période de 1 heure pour le méthanol et de 24 heures pour l'acétone.

Dans le cas du sédiment, le mélange sédiment + solvant subit une sonication, le tube est introduit dans un récipient rempli de glace et recouvert d'aluminium. On laisse agir les ultra-sons à l'aide d'un sonicateur (Vibracell, 20 kHz, équipé d'une micro-sonde de 3 mm, amplitude 190 µm) 1 minute, à 50% du cycle actif, pour une puissance de sonication de 180 W (la pointe de la sonde à ultra-sons est à 1 cm au-dessus du sédiment).

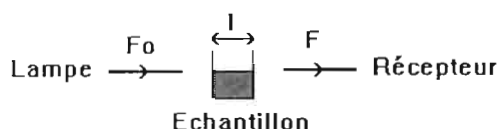
L'extrait méthanolique ou acétonique est filtré sur membrane GF/C (porosité de 1,2 µm) afin d'obtenir un extrait limpide. Pour les échantillons de sédiments, après filtration, les tubes sont mis à l'étuve pendant 48 heures pour déterminer leur poids sec (Ps).

5 Phase analytique

5.1 Analyse spectrophotométrique

5.1.1 Principe

Les mesures de spectrophotométrie font appel aux propriétés de la lumière et à la loi de Beer-Lambert :



loi de Beer-Lambert :

$$A = \log \frac{F_0}{F}$$

$$A = Ecl$$

A = absorbance

E = coefficient d'absorption spécifique de l'échantillon

c = concentration de l'échantillon

l = longueur de la cuve (cm)

Pour rester dans le domaine linéaire de la loi de Beer-Lambert, il est nécessaire de travailler à de faibles absorbances, $A < 0,9$.

5.1.2 Mode opératoire

L'absorbance de l'extrait pigmentaire est mesurée à 665 et à 750 nm (pour le calcul du blanc de turbidité) avant puis après acidification.

De façon générale, les auteurs recommandent un extrait acidifié de 0,003 mol.l⁻¹ de solvant (Aminot et Chaussepied, 1983; Parsons *et al*, 1984; Garrigue et Di Matteo, 1991) à 0,005 mol.l⁻¹ de solvant (Garrigue et Di Matteo, 1991; Pujo-Pay, 1995).

Il est important de déterminer le **blanc de cuve**, mesuré à partir du solvant d'extraction utilisé; **les blancs de filtre**, mesurés à partir de filtres sur lesquels est filtrée de l'eau déminéralisée et qui ont subi le même traitement que les autres échantillons; ainsi que **les blancs de turbidité** de chaque échantillon.

Le blanc de turbidité d'un échantillon résulte de la présence de fines particules dans l'extrait. La mesure de ce blanc s'effectue à la longueur d'onde de 750 nm, à laquelle les pigments n'absorbent pas.

L'absorbance brute (A_b) de chaque échantillon est alors corrigée afin d'obtenir une absorbance nette (A) que l'on utilise ensuite lors des calculs.

$$A^{na}_{665} = A_b^{na}_{665} - A_b^{na}_{750} \quad (\text{avec } A^{na}_{665} = \text{absorbance nette de l'extrait non acidifié}).$$

5.2 Analyse fluorimétrique et calibration du fluorimètre

5.2.1 Principe

L'utilisation du fluorimètre repose sur la fluorescence de la chlorophylle, c'est à dire sur sa capacité à absorber de la lumière à une longueur d'onde donnée et d'en réémettre à une longueur d'onde supérieure.

5.2.2 Mode opératoire

L'appareil est allumé une heure avant les mesures pour stabiliser la lampe. Le zéro est réglé avec un tube témoin contenant du solvant pur.

Les échantillons sont transvasés dans un 1^{er} tube en verre (tube de mesure fluorimétrique de 10 ml avec bouchon en bakélite et rondelle téflon) pour mesurer la fluorescence (Fo). L'échantillon est ensuite acidifié avec 60µl d'acide chlorydrique dans un deuxième tube pour mesurer la fluorescence après acidification (Fa). L'extrait est acidifié à 0,005 mole.l⁻¹ en concentration finale.

5.2.3 Calibration du fluorimètre

La calibration est réalisée à partir d'un standard de chlorophylle *a* pur dont la concentration est déterminée par dosage spectrophotométrique. Ce standard de chlorophylle *a* pur du commerce (Sigma) est divisé en deux, une partie est diluée dans de l'acétone à 90%, l'autre partie dans du méthanol.

Les équations utilisées pour déterminer la concentration de chlorophylle dans nos deux solutions mères (acétone et méthanol) sont tirées des équations spectrophotométriques de Lorenzen (Lorenzen, 1967) :

Dans l'acétone à 90% :

$$\begin{aligned}[\text{Chl.}a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 26,7 (A^{\text{na}}_{665} - A^a_{665}) / l \\ [\text{Phéo.}a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 26,7 (1,7 \times A^a_{665} - A^{\text{na}}_{665}) / l\end{aligned}$$

Dans le méthanol à 99,9% :

$$\begin{aligned}[\text{Chl.}a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 40,1 (A^{\text{na}}_{665} - A^a_{665}) / l \\ [\text{Phéo.}a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 40,1 (1,5 \times A^a_{665} - A^{\text{na}}_{665}) / l\end{aligned}$$

Avec *l* : longueur de la cuve (cm).

Une gamme de dilution est réalisée à partir de ces deux solutions mères pour le calcul des coefficients d'étalonnages. Les résultats de l'étalonnage sont reportés en annexe 2. Des coefficients Ko et Ka sont déterminés (pente des droites d'étalonnage) pour le calcul de la concentration en Chlorophylle *a* des échantillons à partir de Fo, Fa et des conditions d'utilisation du fluorimètre (fente et filtre utilisés), à l'aide des équations de Lorenzen (1966), décrites au paragraphe 5.3.2.

5.3 Calcul, expression des résultats

5.3.1 Equations spectrophotométriques

D'après Lorenzen (1967) : pour l'acétone à 90% :

$$\begin{aligned}[\text{Chl } a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 26,7 (A^{\text{na}}_{665} - A^a_{665}) \times v / (l \times V) \\ [\text{Phéo } a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 26,7 (1,7 \times A^a_{665} - A^{\text{na}}_{665}) \times v / (l \times V)\end{aligned}$$

et pour le méthanol à 100%:

$$\begin{aligned}[\text{Chl } a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 40,1 (A^{\text{na}}_{665} - A^a_{665}) \times v / (l \times V) \\ [\text{Phéo } a] (\mu\text{g.l}^{-1}) &= 40,1 (1,5 \times A^a_{665} - A^{\text{na}}_{665}) \times v / (l \times V)\end{aligned}$$

Avec :

- V : volume d'eau de mer filtrée (litres) ou poids sec de sédiment (Ps en g) (cf. paragraphe 5 Mode opératoire) suivant le milieu analysé. Dans le cas du sédiment, la concentration de chlorophylle sera exprimé en µg/g de poids sec.
- v : volume du solvant d'extraction (ml),
- l : longueur de la cuve utilisée dans le spectrophotomètre,
- A_{665}^{na} : Absorbance de l'extrait non acidifié mesurée à 665nm,
- A_{665}^a : Absorbance de l'extrait acidifié mesurée à 665 nm.

Dans les deux cas :

$$[Chl a \text{ tot}] = [Chl a] + [Phéo a]$$
$$\% Chl a = [Chl a] \times 100 / [Chl a \text{ tot}]$$

5.3.2 Equations fluorimétriques

Les mêmes équations sont utilisées, aussi bien pour le méthanol que l'acétone à 90%, pour évaluer les concentrations de chlorophylle (d'après les formules de Lorenzen *in* Pujo-Pay, 1995) :

$$[Chl a] (\mu g.l^{-1}) = (F_o - F_a) / (K_o - K_a) \times v / V$$
$$[Phéo a] (\mu g.l^{-1}) = (K_o \times F_a - K_a \times F_o) / (K_a (K_o - K_a)) \times v / V$$

Avec :

- F_o : fluorescence avant acidification,
- F_a : fluorescence après acidification,
- v : volume de solvant d'extraction utilisé,
- V : volume d'eau de mer filtrée (ml) ou poids sec de sédiment (kg),
- K_o et K_a : coefficients d'étalonnage du fluorimètre variant suivant la fente utilisée.

6 Mise au point méthodologique

6.1 Dans la colonne d'eau

6.1.1 Comparaison spectrophotomètre et fluorimètre dans le méthanol

3 litres d'eau de la station 23 (17 juillet 96) sont filtrés sur des filtres Whatman GF/F (47 mm de diamètre) pour le dosage spectrophotométrique, et 300 ml sur des filtres Whatman GF/F (25 mm de diamètre) pour le dosage fluorimétrique.

Tableau 1 : Comparaison des méthodes spectrophotométrique et fluorimétrique pour le dosage de la chlorophylle dans l'eau lagunaire, extraction au méthanol, (moyennes ± écarts types).

Spectrophotométrie	µg chl.a.l ⁻¹
Blanc de filtre	0,04 ± 0,12 (n = 2)
Echantillon	0,83 ± 0,04 (n = 3)
Fluorimétrie	µg chl.a.l ⁻¹
Blanc de filtre	0,08 ± 0,00 (n = 2)
Echantillon	1,25 ± 0,00 (n = 3)

Les résultats en chlorophylle *a* apparaissent 1,5 fois plus élevés en fluorimétrie que ceux obtenus en spectrophotométrie.

Les absorbances mesurées au spectrophotomètre (le blanc de turbidité soustrait) sont de l'ordre de 0,08 pour les échantillons non acidifiés et de 0,05 pour les échantillons acidifiés, en filtrant 3 litres d'eau. L'appareil étant beaucoup moins précis dans de faibles absorbances, il est préférable de

travailler à des absorbances beaucoup plus élevés (de 0,1 à 0,6) en filtrant des volumes d'eau de mer plus importants.

En contrepartie, l'augmentation du volume d'eau de mer filtrée sur un même filtre augmente les risques de colmatage, et donc la perte de chlorophylle due à la lyse des cellules. Ces phénomènes de colmatage et d'imprécision expliqueraient la différence des résultats obtenus entre la fluorimétrie et la spectrophotométrie. Nous avons donc décidé, pour la suite de l'étude, d'utiliser le fluorimètre pour toutes les expériences qui suivent.

6.1.2 Comparaison acétone (90%) et méthanol (100%) au fluorimètre

Le solvant le plus utilisé est l'**acétone à 90 %** car les coefficients d'absorption spécifique des chlorophylles dans ce solvant sont bien connus. Le **méthanol** est cependant considéré comme un meilleur solvant : l'extraction est plus rapide et plus complète pour certaines espèces d'algues. Toutefois, avec le plancton marin côtier, des résultats comparables sont obtenus avec le méthanol et l'acétone à 90 %, si ce dernier solvant agit assez longtemps (Aminot et Chaussepied, 1983).

Suivant les différents auteurs, les avis étant partagés, nous avons recherché le solvant qui était le plus adapté à nos échantillons.

300 ml d'eau lagunaire sont filtrés (14 mai 96) en duplicat sur des filtres Whatman GF/F (25 mm de diamètre) à 5 stations différentes.

Tableau 2 : Comparaison des 2 solvants : méthanol et acétone à 90%, pour le dosage de la chlorophylle par fluorimétrie dans la colonne d'eau (moyennes \pm écarts types des duplicats).

Station	méthanol 100%	acétone 90%	Rapport
	$\mu\text{g chl } a.l^{-1}$	$\mu\text{g chl } a.l^{-1}$	(méth/acét)
1	$0,54 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,03$	1,49
17	$0,48 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,14$	1,23
18	$0,34 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,02$	1,42
19	$0,40 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	1,42
23	$1,06 \pm 0,09$	$0,53 \pm 0,06$	1,42

Les résultats sont reproductibles, excepté à la station 17 pour le dosage à l'acétone ($0,39 \pm 0,14 \mu\text{g chl } a.l^{-1}$). Ces résultats nous montrent que les concentrations en chlorophylle *a* sont en moyenne 1,4 fois supérieures avec le méthanol. Il semblerait donc que le méthanol soit plus efficace que l'acétone à 90% dans ces conditions expérimentales.

6.1.3 Test de comparaison de « mélange » des extraits méthanoliques

La façon dont l'extrait est agité ou encore l'utilisation de broyeur ou de désintégateur à ultrason peut modifier le rendement de l'extraction.

Afin d'examiner si une forte agitation ou un simple retournement de tube assurent une extraction équivalente de la chlorophylle par le méthanol, le dosage de chlorophylle est effectué sur 2 sous-échantillons de la même eau ayant subi; l'un, une forte agitation manuelle du tube, et l'autre, un simple retournement du tube.

200 ml d'eau de la station 23 (29 mai 96) sont filtrés en triplicat sur des filtres Whatman GF/F (25 mm de diamètre).

Les échantillons qui n'ont pas subi d'agitation classique, subissent simplement un retournement de tube. Le filtre ne se désintègre pas, il n'est pas nécessaire d'effectuer une seconde filtration après la période d'extraction.

Conditions expérimentales :

- expérience 1 : échantillon n'ayant pas subi de forte agitation (simple retournement de tube),
- expérience 2 : échantillon ayant subi une forte agitation ainsi qu'une seconde filtration.

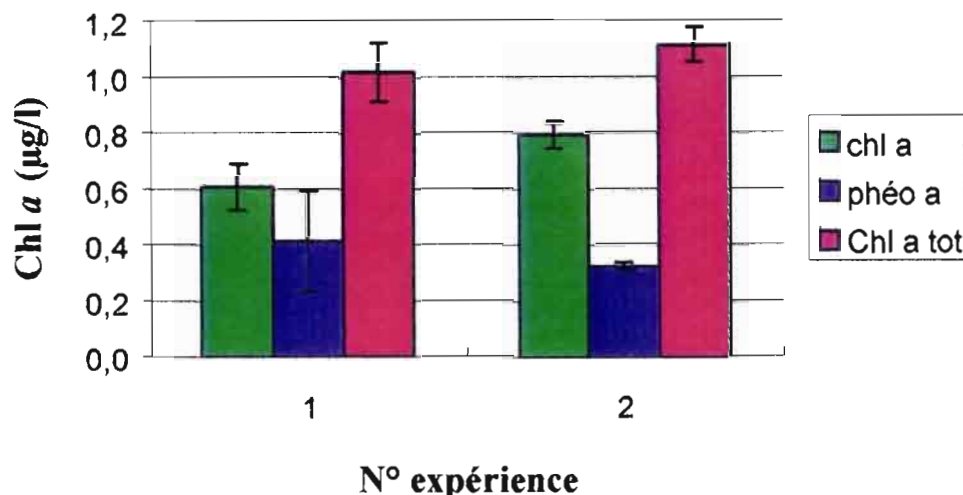


Figure 7 : Comparaison de 2 techniques d'agitation des extraits méthanoliques (moyennes et écarts types des triplicats).

Les résultats (figure 7) montrent bien qu'une importante agitation de l'extrait est nécessaire afin de s'assurer que l'on extrait le maximum de chlorophylle, (gain de 16%). En revanche, cette manipulation nécessite une seconde filtration.

6.1.4 Test de durée d'extraction dans le méthanol

La durée d'extraction de la chlorophylle dépend de la nature du solvant utilisé. D'après Neveux *et al* (1990), il suffirait de 1 à 2 heures d'extraction (échantillon à l'obscurité et au réfrigérateur) pour l'acétone à 90% après avoir broyé le filtre avec une baguette en verre. Aminot et Chaussepied (1983) recommandent une vingtaine d'heures au réfrigérateur et à l'obscurité dans l'acétone à 90% et une heure à température ambiante et à l'obscurité dans le méthanol (dans les deux cas, le filtre a été au préalable déchiqueté à l'aide d'une baguette en verre). Certains auteurs affirment que 30 minutes suffisent pour l'extraction au méthanol, et que si la période dépasse 1 heure, la chlorophylle risque de se dégrader en phéopigments (Pujo-Pay, 1995).

200 ml d'eau de la station 23 (15 mai 96) sont filtrés en duplicat sur des filtres Whatman GF/F (25 mm de diamètre).

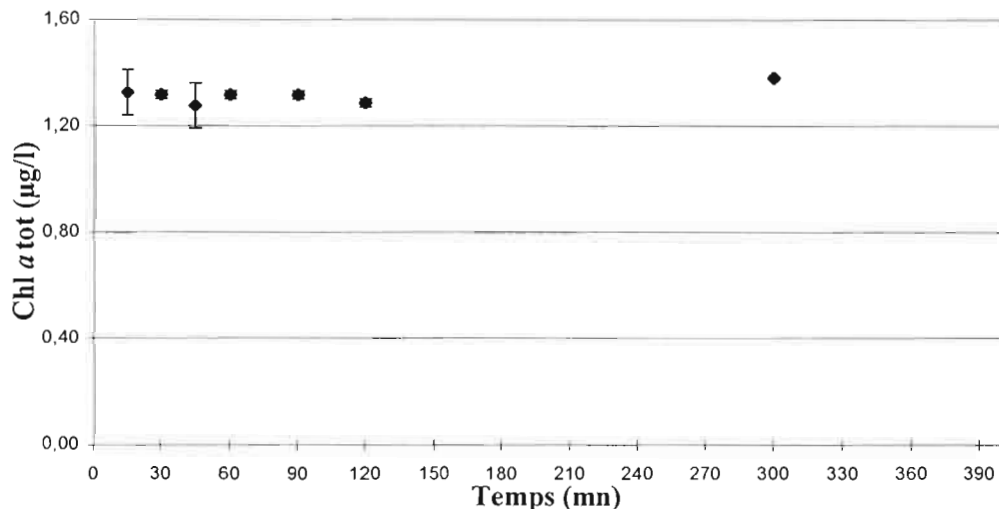


Figure 8 : Comportement de la chlorophylle a totale en fonction de la durée d'extraction dans le méthanol (moyennes et écarts types du duplicat).

Les résultats obtenus (figure 8) ne sont pas significativement différents. Nous avons donc conclu que toute la chlorophylle était extraite en 15 minutes et que celle-ci ne se dégradait pas au moins jusqu'à une durée de 5 heures d'extraction.

Un temps d'extraction de 1 heure est néanmoins choisi pour le méthanol afin que tous les échantillons subissent le même traitement.

6.1.5 Conclusion

Trois idées sont à retenir de cette mise au point méthodologique :

- Le fluorimètre est plus sensible et nécessite donc un volume d'eau filtré plus faible que pour la mesure au spectrophotomètre, ce qui limite les risques de colmatage du filtre.
- Dans le milieu océanique (station 1) comme dans le milieu lagunaire, le méthanol nous semble beaucoup plus intéressant d'une part parce qu'il extrait mieux la chlorophylle que l'acétone (1,4 fois plus), et d'autre part parce qu'il est plus rapide (1h d'extraction au lieu de 24h pour l'acétone à 90%).
- L'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction nécessite une forte agitation de l'échantillon et une seconde filtration avant l'analyse fluorimétrique.

6.2 Dans le sédiment

Comme pour la colonne d'eau, une comparaison entre les 2 techniques spectrophotométrique et fluorimétrique ainsi qu'entre les 2 solvants d'extraction (acétone à 90% et méthanol à 100%) a été réalisée dans les sédiments.

6.2.1 Comparaison spectrophotomètre et fluorimètre dans l'acétone

Les échantillons de sédiments superficiels (les 10 premiers cm) de la carotte B sont passés en triplicats simultanément au fluorimètre et au spectrophotomètre.

La figure 9 représente les concentrations en chlorophylle a totale déterminées par fluorimétrie en fonction de celles déterminées par spectrophotométrie.

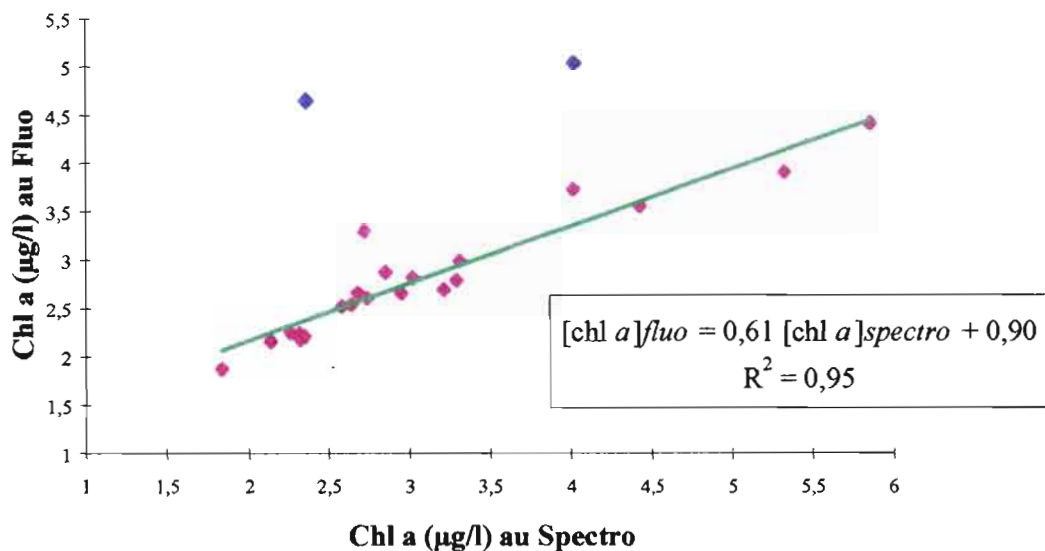


Figure 9 : Comparaison des deux techniques : spectrophotométrie et fluorimétrie (carotte B).

Un modèle d'ajustement linéaire est calculé. Pour les dix premiers centimètres du sédiment, seuls deux points notés entre parenthèse ne s'ajustent pas sur ce modèle. La corrélation entre la fluorimétrie et la spectrophotométrie est forte ($R^2 = 0,95$). La pente de la droite de régression est égale à 0,61, ce qui permet de dire qu'il existe une différence entre les deux méthodes. Nous obtenons des valeurs plus fortes au spectrophotomètre par rapport au fluorimètre.

6.2.2 Comparaison acétone (90%) et méthanol (100%) au fluorimètre

Après avoir montré qu'il existait une différence entre les deux techniques d'analyses, nous avons comparé les deux solvants d'extraction. Pour cela, nous avons effectué un profil de la concentration de chlorophylle *a* totale sur des triplicats sur l'ensemble de la carottes B.

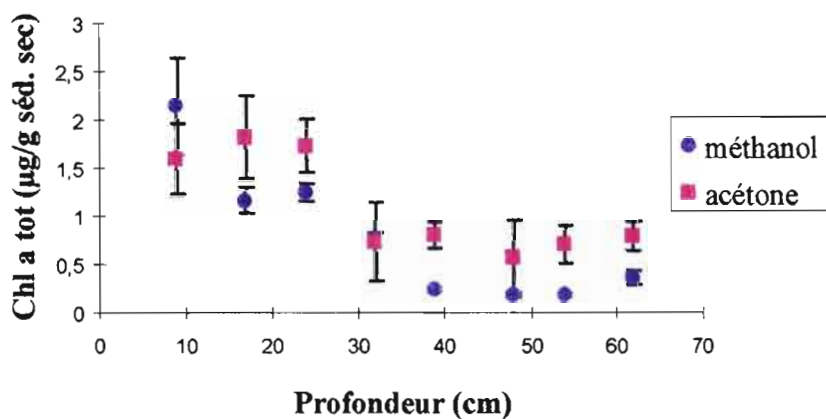


Figure 10 : Evolution de la chlorophylle *a* totale en fonction de la profondeur (carotte B). Comparaison des deux solvants d'extraction : acétone + ultra-sons et méthanol sans ultra-sons (moyennes et écarts types des triplicats).

Il apparaît d'après la figure 10 que l'acétone soit plus efficace que le méthanol, dans nos conditions expérimentales. Les concentrations en chlorophylle diminuent de $1,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ à 17 cm de profondeur jusqu'à $0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour les sédiments profonds avec le méthanol alors que les valeurs varient de 1,8 à $0,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour l'acétone.

6.2.3 Conclusion

La comparaison des techniques utilisées nous montre qu'il existe une différence entre l'utilisation du spectrophotomètre et du fluorimètre dans les conditions expérimentales précitées. De plus, nous avons pu mettre en évidence une différence entre les deux solvants d'extraction utilisés. L'acétone paraît être plus efficace. Il serait intéressant de comparer l'utilisation de l'acétone avec celle du méthanol dans les mêmes conditions, c'est à dire en effectuant une sonication aux échantillons dans les deux cas et en employant un temps d'extraction identique.

7 Résultats des dosages Antropic

7.1 Colonne d'eau et matériel particulaire

Les dosages de chlorophylle des échantillons Antropic, provenant des prélèvements mensuels de la colonne d'eau sur les 23 stations et du matériel particulaire sur les 6 stations, ont été effectués en routine au méthanol. Tous les échantillons ont subi une forte agitation manuelle et une seconde filtration avant le passage au fluorimètre.

La capacité analytique est de 70 échantillons par jour (les filtrations ayant été effectuées au préalable).

7.1.1 Colonne d'eau

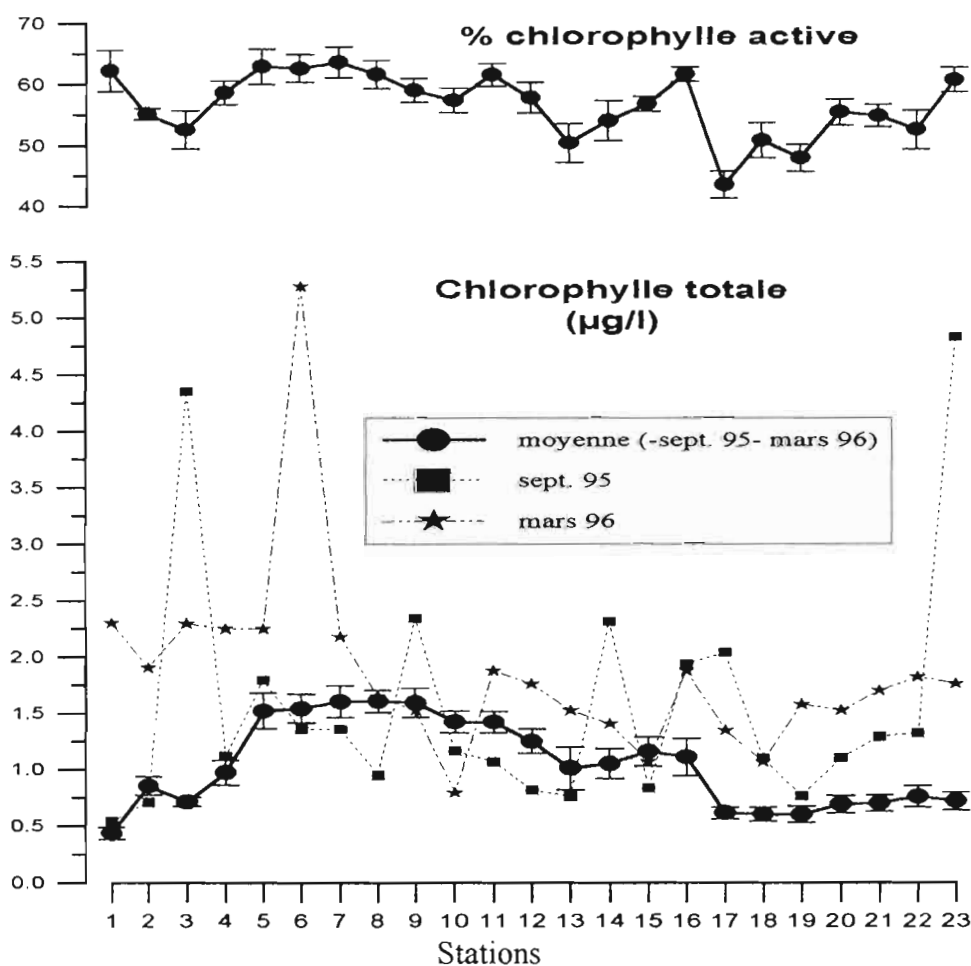


Figure 11 : Répartition de la chlorophylle a totale dans la colonne d'eau et du pourcentage de la chlorophylle a active (moyennes et écarts types des mois d'octobre 95 à juin 96 sans le mois de mars 96 et des deux mois atypiques).

Les valeurs de chlorophylle obtenues sur l'ensemble des mois étudiés (de septembre 95 à juin 96) varient beaucoup selon les périodes considérées (résultats en annexe 3). La moyenne effectuée sur la période étudiée n'est pas significative car les écarts types sont très importants. Par contre, si l'on retire les valeurs importantes correspondant aux mois de septembre 95 et mars 96, les écarts types diminuent fortement (figure 11). Le mois de septembre 95 correspond à une période de forte pluie et le mois de mars 96 à une période « d'eaux vertes », ce qui explique les fortes valeurs obtenues.

Les concentrations moyennes de chlorophylle *a* totale varient de 0,44 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (station 1, référence océanique) à 1,76 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (station 6). D'après la figure, nous retrouvons bien un maximum de chlorophylle dans la zone du port (stations 4 à 10) ainsi qu'un minimum en station océanique et aux stations à forte influence océanique (stations 18 et 19). Il est intéressant de signaler que le pourcentage de chlorophylle *a* active est relativement important (65%) par rapport à la chlorophylle *a* totale, et peut aller jusqu'à 78% en station océanique (mars 96 en période « d'eaux vertes » annexe 3').

7.1.2 Matériel particulaire

Les résultats obtenus sur les 10 mois analysés sur les 6 sites étudiés sont en annexe 4.

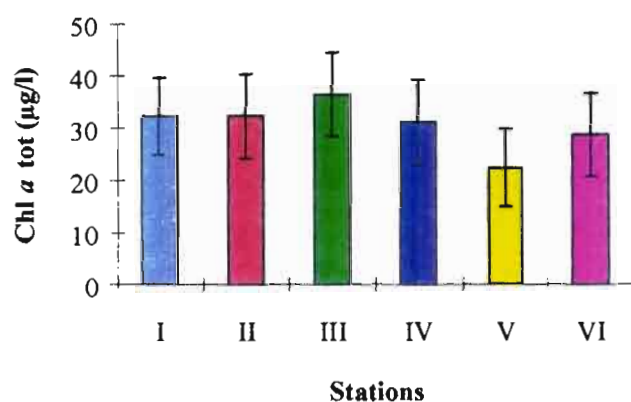


Figure 12 : Répartition de la chlorophylle a totale dans le matériel particulaire (moyennes et écarts types des mois d'octobre 95 à juin 96 sans le mois de mars 96).

De la même façon que pour la colonne d'eau, une moyenne de tous les prélèvements nous donne des valeurs très peu significatives en raison des fortes variations de chlorophylle dans le temps. En revanche, si l'on retire les mois de septembre 95 et de mars 96 à cette moyenne (caractérisés comme la colonne d'eau par de très fortes valeurs), nous retrouvons une situation régulière (figure 12).

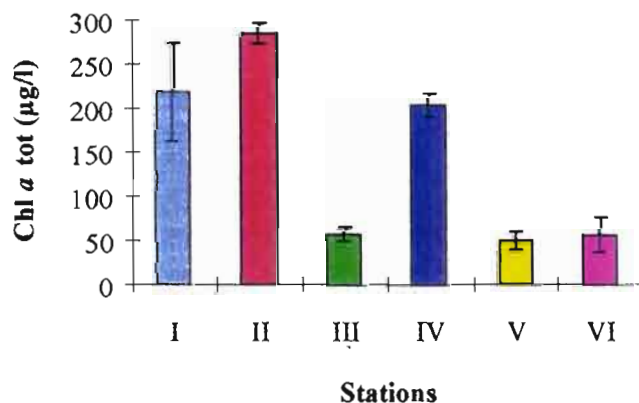


Figure 13 : Répartition de la chlorophylle a totale dans le matériel particulaire pour le mois de septembre 95 (moyennes et écarts types des triplicats).

En ne prenant que les valeurs de chlorophylle obtenues pour le mois de septembre 95, la figure 13 nous montre 2 situations différentes : d'une part, les stations 1, 2 et 4 qui présentent de fortes valeurs (4 à 5 fois supérieures à la normale) et d'autre part, les stations 3, 5 et 6 dont les valeurs sont comparables aux moyennes annuelles.

Les stations 1, 2 et 4 sont situées à des embouchures de rivières ce qui pourrait expliquer les fortes concentrations en chlorophylle obtenues en période de fortes pluies.

7.2 Le sédiment

Les dosages de chlorophylle des échantillons Antropic, provenant des prélèvements de sédiments, ont été effectués en routine dans de l'acétone sur les quatre carottes A, B, C et D, les résultats sont exprimés en annexe 5. Seuls les résultats de la carotte B sont présentés ci-dessous. Tous les échantillons ont subi une forte agitation manuelle, une sonication et une seconde filtration avant le passage au fluorimètre et au spectrophotomètre.

La capacité analytique est de 25 échantillons de sédiments par jour, environ trois fois plus faible que dans la colonne d'eau.

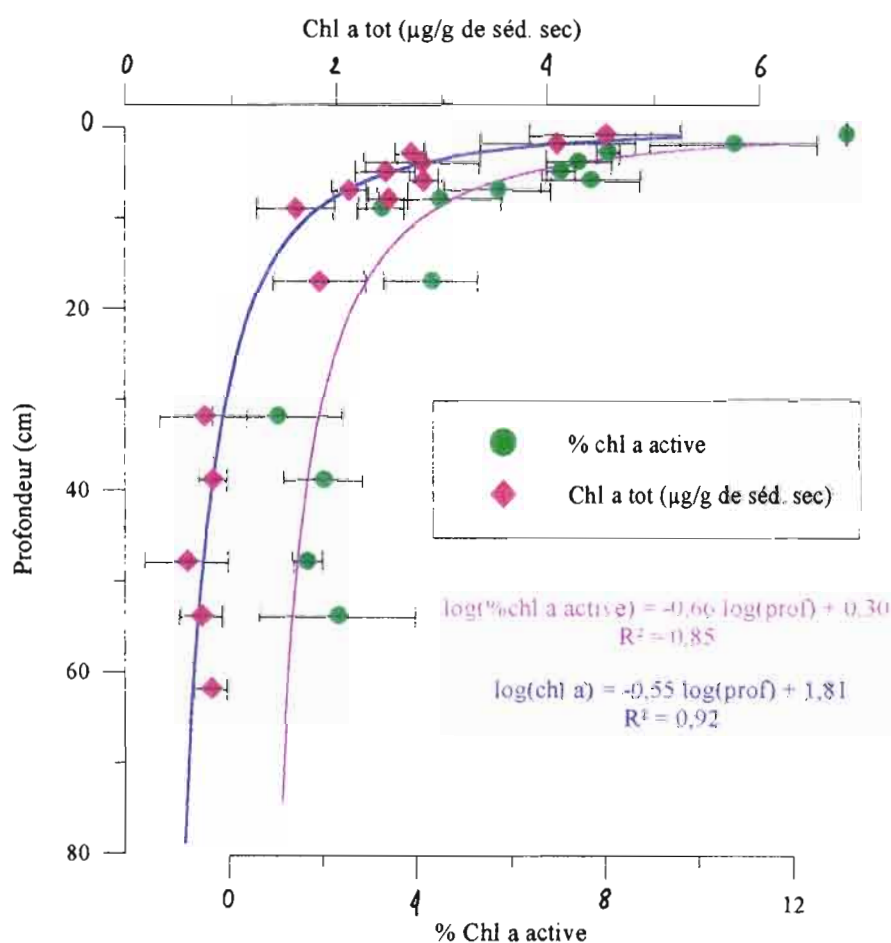


Figure 14 : Evolution de la chlorophylle a totale et du pourcentage de chlorophylle a active dans la carotte B (moyennes et écarts types des triplicats).

Contrairement à la colonne d'eau, la chlorophylle a totale dans le sédiment est principalement présente sous la forme de ses pigments dégradés. La chlorophylle a « active » ne représente que 5 à 15% de la chlorophylle a totale. Les valeurs de chlorophylle a totale s'échelonnent de 1 à 4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec.

De façon générale, les concentrations en chlorophylle a totale et active diminuent de façon logarithmique avec la profondeur (figure 14).

8 Mise au point méthodologique pour l'utilisation des filtres Millex

8.1 Mode opératoire

8.1.1 Filtration

Les unités de filtration à seringue Millex (la membrane et le support en matière plastique formant une seule unité) sont composées de membrane Durapore® (type GV) de 0,22 µm de porosité). La filtration de l'échantillon s'effectue à l'aide d'une seringue stérile en polypropylène de 50 ml.

8.1.2 Extractions des pigments chlorophylliens

Contrairement aux filtres classiques, les unités de filtration Millex ne peuvent pas être directement dissoutes dans le solvant d'extraction. Nous avons choisi d'en extraire la chlorophylle en passant 1 ml de méthanol au moyen d'une seringue à travers la membrane du filtre Millex toutes les 5 minutes pour obtenir 7 ml d'extrait.

8.1.3 Lecture de la fluorescence et expression des résultats

L'extrait récolté est ensuite passé au fluorimètre dans les mêmes conditions que décrites au paragraphe 4. La concentration en chlorophylle est calculée à l'aide des formules de Lorenzen données au paragraphe 5.2.3.

8.2 Résultats méthodologiques

Pour tester l'efficacité de l'extraction de la chlorophylle sur les filtres Millex, la même quantité d'eau est filtrée sur deux filtres différents et sur un filtre Whatman GF/F pour comparer les résultats.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- filtre Millex A : 1 ml de méthanol est filtré toutes les 10 min. pendant 70 min.
- filtre Millex B : 1 ml de méthanol est filtré toutes les 5 min. pendant 35 min.
- filtre Whatman GF/F : 7 ml de méthanol.

Tableau 3 : Influence de la durée d'extraction de la chlorophylle pour les filtres Millex et comparaison avec la procédure classique (Whatman GF/F)

Lieu et date de prélèvement	Millex A (70') µg chl a tot.l ⁻¹	Millex B (35') µg chl a tot.l ⁻¹	Whatman GF/F µg chl a tot.l ⁻¹
Station 23 (14 mai 96)	1,59 (n=1)	1,65 (n=1)	1,08 ± 0,01 (n=2)
Station 1 (14 mai 96)	-	0,97 (n=1)	0,74 (n=1)
Station 23 (22 mai 96)	1,09 ± 0,05 (n=2)	-	0,80 ± 0,02 (n=3)

Les résultats du tableau 3 ne font pas apparaître de différence significative entre l'extraction de 70 minutes et celle de 35 minutes.

Nous avons repassé 1 ml de méthanol toutes les 5 minutes pendant 35 minutes sur des filtres ayant déjà subi une première extraction. La fluorescence de l'extrait récolté était nulle. Nous en avons déduit que toute la chlorophylle avait été extraite lors de la première extraction.

Par ailleurs, on observe une différence entre l'utilisation des unités de filtration Millex et les filtres classiques GF/F. Il semblerait qu'il y ait moins de chlorophylle retenue sur ces derniers. Cette sous-estimation (d'environ 30%) pourrait s'expliquer par les différences de porosité de ces deux filtres. Certaines communautés phytoplanctoniques (de taille comprise entre 0,22 et 0,7 μm) ne seraient pas retenues sur les filtres Whatman.

Pour vérifier cette hypothèse, la même expérience est renouvelée à la station 23. Nous avons complété cette expérience en filtrant de l'eau de mer successivement sur filtre Whatman puis sur filtre Millex (on note alors GF/F, Millex).

Tableau 4 : Test de comparaison des filtres GF/F et Millex.

Lieu et date de prélèvement	Millex B $\mu\text{g chl } a \text{ tot. l}^{-1}$	Whatman GF/F $\mu\text{g chl } a \text{ tot. l}^{-1}$	GF/F, Millex $\mu\text{g chl } a \text{ tot. l}^{-1}$
Station 23 (17 juillet 96)	$1,62 \pm 0,07$ (n=2)	$1,54 \pm 0,01$ (n=2)	$0,04 \pm 0,02$ (n=2)

Contrairement à l'expérience précédente, les résultats du tableau 4 ne montrent pas de différence entre l'utilisation des deux filtres. Le résultat des filtrations successives confirme cette observation. En effet, la concentration obtenue (0,04 $\mu\text{g/l}$) est proche du seuil de détection de la méthode (LD = 0,023 à 0,07 $\mu\text{g chl } a \text{ .l}^{-1}$).

Le filtre Millex ne surestime donc pas systématiquement la concentration de chlorophylle par rapport au filtre Whatman dans ces conditions expérimentales. Les différences entre les deux expériences réalisées à deux mois d'intervalles pourraient s'expliquer par des communautés phytoplanctoniques différentes entre les deux prélèvements. Ce sujet reste controversé (Dickson, 1993 et Chavez, 1995).

Pour conclure, nous admettons d'après les expériences effectuées :

- que les filtres Millex retiennent au moins autant de phytoplancton que les filtres Whatman GF/F,
- que l'extraction de la chlorophylle est complète sur les filtres Millex en filtrant 1 ml de méthanol toutes les 5 minutes à concurrence de 7 ml.

Enfin, il est préférable de prendre des précautions quant à la comparaison entre les résultats obtenus suivant les deux différents types de filtres utilisés pour le dosage de la chlorophylle. En effet, suivant la nature de l'échantillon analysé, les deux types de filtres, présentant des caractéristiques différentes, ne retiennent pas systématiquement le même matériel. La différence observée occasionnellement entre Millex et Whatman GF/F mériterait d'être vérifiée plus régulièrement dans ce type de milieux.

8.3 Test de durée de conservation des filtres Millex

Dans le cadre du PGRN-2, nous avons cherché à mesurer l'évolution de la concentration de la chlorophylle *a* totale en fonction de la durée de conservation des filtres Millex au sec et à température ambiante.

Une première expérience a été réalisée sur une durée de 15 jours. 50 ml d'eau de la station 23, le 22 mai 96, sont filtrés sur 10 filtres Millex, afin d'obtenir 5 points de mesure en duplicat qui sont analysés à différentes périodes. Les mesures se font par fluorimétrie avec du méthanol à 100 %.

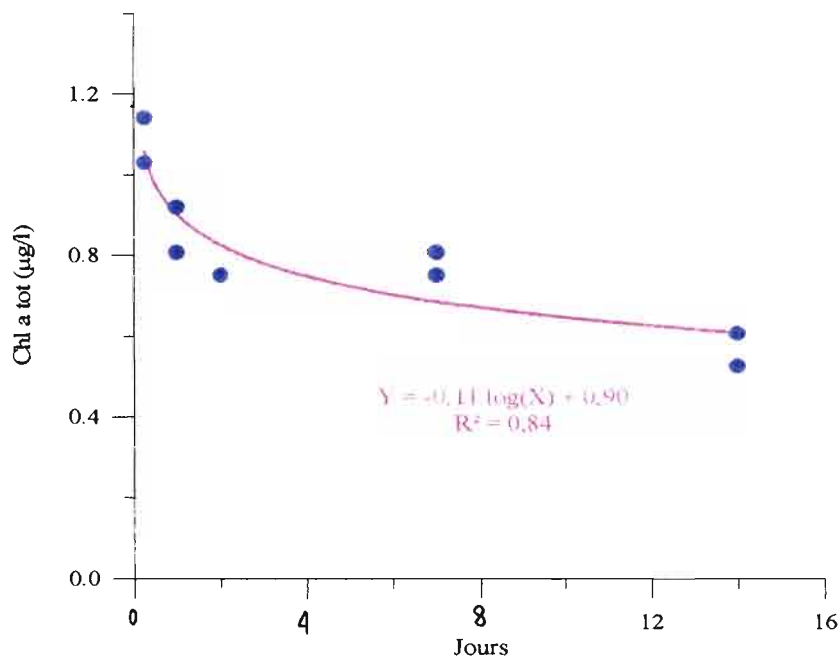


Figure 15 : Test de conservation des filtres Millex à température ambiante (1^{ère} expérience).

Nous observons sur la figure 15 une diminution de la concentration en chlorophylle au cours du temps. Cette diminution semble suivre une tendance logarithmique ($R^2 = 0.84$). Entre t_{-1j} et t_{14j} , la concentration en chlorophylle a totale chute de 30%.

Une deuxième expérience est réalisée le 24 juin 96 sur une durée de 60 jours. 65 ml d'eau de la station 23 sont filtrés sur une trentaine de filtres Millex. Les mesures sont effectuées en triplicat après stockage à l'obscurité, au sec et à température ambiante ou à +4 °C.

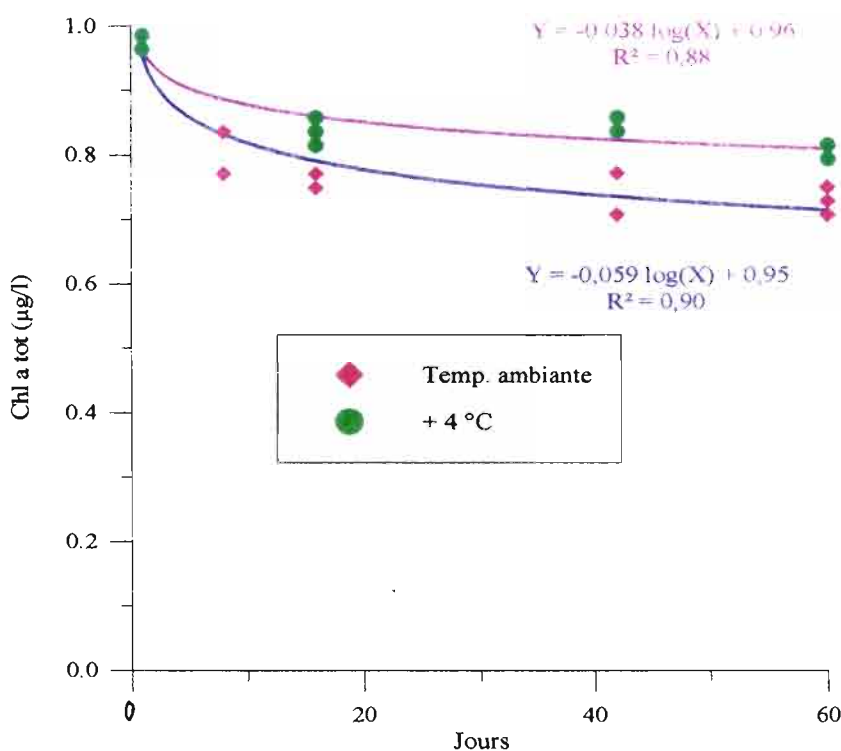


Figure 16 : Test de conservation des Millex au froid (+4°C) et à température ambiante (+28°C) (2^{ème} expérience).

La concentration en chlorophylle *a* totale (figure 16) diminue au cours du temps en suivant une évolution comparable à l'expérience précédente (tendance logarithmique $R^2 = 0.90$). On observe une diminution de 20% entre t_{+1j} et t_{+16j} . Cette diminution apparaît plus faible que dans le cas précédent (30%). D'autre part, il apparaît une différence entre le cas où le filtre est conservé à température ambiante et celui où le filtre est conservé à +4°C. La chlorophylle se dégrade donc plus lentement lorsque les filtres sont conservés au froid.

8.4 Conclusion

Si la dégradation apparaît rapide dans les 15 premiers jours, elle tend à se stabiliser par la suite. Une conservation de 2 mois sous-estime la concentration initiale en chlorophylle d'environ 25% à température ambiante et de 16% à +4°C. Toutefois, il semblerait que suivant la nature de l'échantillon, la vitesse de dégradation de la chlorophylle soit variable.

Il serait peut-être judicieux de conserver un échantillon d'eau préservée au glutaraldéhyde parallèlement aux filtrations sur Millex pour estimer la composition phytoplanctonique des échantillons afin d'évaluer si les différences de conservation sont dues à des différences de peuplements.

9. Conclusion générale

Les dosages de la chlorophylle effectués au cours de ce stage ont mis en évidence qu'un seul mode opératoire n'était pas applicable à tous les milieux étudiés. Ainsi, pour la colonne d'eau, la spectrophotométrie s'avère moins sensible que la fluorimétrie pour un même volume d'eau filtrée et le méthanol apparaît être un meilleur solvant d'extraction que l'acétone.

Pour le sédiment où la concentration en pigments est nettement plus concentrée que dans la colonne d'eau, en revanche, nous avons pu mettre en évidence une différence entre les deux méthodes (spectrophotométrie et fluorimétrie). Par ailleurs, l'acétone paraît être plus efficace que le méthanol dans ce milieu (dans nos conditions expérimentales). Nous avons pu observer que ce milieu était très différent de la colonne d'eau (fortes proportions en phéopigments). Des analyses chromatographiques permettraient de connaître la composition pigmentaire de façon plus précise et de vérifier la validité des équations de Lorenzen dans les sédiments.

Concernant l'étude réalisée sur les filtres Millex, il est évident qu'il n'était pas possible d'évaluer précisément la cinétique de dégradation des pigments dans le cadre de ce stage d'une durée limitée. Les résultats obtenus montrent néanmoins que l'utilisation des unités de filtration Millex semble être une perspective intéressante pour le dosage de la chlorophylle dans l'eau lagonaire. Ils sont faciles d'utilisation par rapport aux filtres classiques et les tests effectués nous ont montré que ces unités de filtration pouvaient être utilisées dans des conditions de conservation rudimentaires.

DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE PARTICULAIRE

1 Principe de la méthode de dosage

Le dosage du phosphore organique particulaire dans de l'eau de mer a été effectué selon le principe d'oxydation humide au persulfate de potassium décrit par Pujot-Pay et Raimbault (1994). Cette méthode consiste à oxyder toute la matière organique récupérée sur les filtres Whatman GF/F (0,7 μm). La concentration en phosphore minéral dissous (ions orthophosphates) est alors mesurée selon le protocole classique décrit par Aminot et Chaussepied (1983) : les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence d'antimoine (III), pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique. Cette forme réduite, de coloration bleue, présente un maximum d'absorbance à 885 nm.

2 Mode opératoire

2.1 Préparation du réactif oxydant

Le réactif oxydant se compose de :

- 15 g de persulfate de potassium
- 7,5 g d'acide borique
- 70 ml d'hydroxyde de sodium à 1,5 M (60 g.l⁻¹)

Le tout est ajusté à 250 ml d'eau déionisée (Milli-Q).

Le réactif oxydant se conserve à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant environ une semaine.

2.2 Préparation des échantillons

L'eau de la station 23 utilisée pour les différentes expériences a été prélevée en surface à l'aide de bidon en polyéthylène de 5 litres.

L'oxydation des échantillons est réalisée dans des flacons en verre borosilicaté de 50 ml (type Schott GL 32) parfaitement propres, débarrassés de toute trace de matière organique par une oxydation préalable à blanc. Pour cela, les flacons, remplis de 20 ml d'eau déionisée et de 2,5 ml de réactif oxydant, sont autoclavés à 120 °C pendant 1 heure.

600 ml d'eau de la station 23 sont filtrés sur des filtres Whatman GF/F (25mm de diamètre) préalablement calcinés à 450 °C pendant 4 heures.

Ces filtres sont placés dans les flacons propres, contenant comme précédemment 20 ml d'eau déionisée et 2,5 ml de réactif oxydant. Les flacons sont alors autoclavés à 120 °C pendant 1 heure.

2.3 Dosage des ions orthophosphates

Le réactif phosphate est préparé à l'aide des 4 solutions suivantes :

- **solution 1** : 15 g de paramolybdate d'ammonium dans 500 ml d'eau distillée.
- **solution 2** : 140 ml d'acide sulfurique ($d=1,84$) dans 900 ml d'eau distillée (la préparation est conservée dans une bouteille en verre brun).
- **solution 3** : 54 g d'acide ascorbique dans 500 ml d'eau distillée.

- **solution 4** : 0,34 g d'oxytartrate de potassium et d'antimoine (III) dissous dans 250 ml d'eau distillée.

Les 4 solutions sont conservées au froid (+ 4°C).

Le réactif phosphate est composé de :

- 20 ml de la solution 1,
- 50 ml de la solution 2,
- 20 ml de la solution 3,
- 10 ml de la solution 4.

Ce réactif ne se conserve pas plus de 6 heures. Il doit être préparé avant chaque série d'analyses.

Après autoclavage, 20 ml d'échantillon sont mélangés à 2,5 ml de réactif phosphate. On attend 10 minutes pour que la réaction soit complète (coloration bleue). La lecture se fait aussitôt après au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 885 nm.

2.4 Préparation de la gamme étalon

Une solution mère de phosphate de potassium anhydre est préparée (0,6805 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau déionisée) pour obtenir une concentration finale de 5 mmol.l^{-1} . De cette solution, une solution fille est préparée à $250 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ à partir de laquelle une gamme étalon est réalisée à 0,5; 1; 2; 5 et $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.

2.5 Analyse spectrophotométrique

Il est important de déterminer le **blanc de cuve** (mesuré à partir d'eau déionisée); le **blanc de réactif** (mesuré à partir de 20 ml d'eau déionisée et de 2,5 ml de mélange réactif), ce blanc doit rester inférieur à 0,005 d'absorbance indiquant ainsi une faible contamination; et enfin **les blancs de filtre**, mesurés à partir de filtres sur lesquels a été filtré de l'eau déionisée et qui a subi le même traitement que les autres échantillons, à savoir l'oxydation humide au persulfate de potassium. Tous ces blancs sont mesurés à 885 nm.

2.6 Calcul, expression des résultats

L'absorbance nette de l'échantillon est calculée par $A = A_{\text{tr}} - b_{\text{r}} - b_{\text{f}}$

avec :

- A_{tr} : absorbance mesurée pour l'échantillon traité,
- b_{r} : absorbance mesurée pour le blanc de réactif,
- b_{f} : absorbance mesurée pour le blanc de filtre.

La concentration en phosphates de l'échantillon est obtenue grâce à la droite d'étalonnage.

Il reste enfin à calculer la concentration de PO_4 corrigée en $\mu\text{mol/l}$ d'eau de mer en fonction du volume d'eau de mer qui a été filtré (600 ml) et du volume (eau déionisée + réactif oxydant) de 22,5 ml dans lequel est plongé le filtre :

$$[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{corrigée}} (\mu\text{mol.l}^{-1}) = P \times A \times (22,5/600)$$

5 Résultats méthodologiques

5.1 Expérience n°1

5.1.1 Conditions expérimentales

Nous avons effectué une expérience afin de tester la conservation du réactif oxydant. Six échantillons d'eau de la station 23 (600 ml) sont filtrés sur 6 filtres Whatman GF/F précalcins à 450°C pendant 4h. Les cinq premiers échantillons ont été oxydés avec un réactif oxydant « neuf », c'est à dire préparé le jour même et le dernier échantillon a été oxydé avec un réactif oxydant préparé 30 jours avant l'expérience. Le détail des calculs se trouve en annexe 9.1.

5.1.2 Résultats

Tableau 5 : Phosphore organique particulaire en station 23 (2 juillet 96) (expérience n°1).

Echantillon	[PO ₄] μmol.l ⁻¹
Réactif neuf	1,56 ± 0,22 (n=5)
Ancien réactif	0,99 (n=1)

Blanc de réactif : 0,003 d'absorbance.

5.1.3 Discussion

Les résultats montrent une différence entre les 5 premiers échantillons et le dernier. Un réactif trop vieux (30 jours) ou mal conservé pourrait sous-estimer la concentration en PO₄ de l'échantillon (35 % dans le cas présent). Cette expérience n'est évidemment pas suffisante pour déterminer la durée pendant laquelle le réactif est utilisable, mais montre que l'âge du réactif est essentiel.

Par précaution, pour les expériences suivantes, un nouveau réactif oxydant a été préparé pour chaque analyse.

5.2 Expérience n°2

5.2.1 Conditions expérimentales

600 ml d'eau de la station 23 sont filtrés sur un filtre Whatman GF/F précalciné à 450°C pendant 4h. L'opération est renouvelée 4 fois sur un même prélèvement d'eau de mer afin d'avoir une estimation de la reproductibilité de l'expérience.

En parallèle, 25 ml d'eau déionisée (EMQ) sont filtrés sur un filtre précalciné ainsi que 25 ml d'eau de mer artificielle (EDM artif; 35,5 g de NaCl dans 1 litre d'eau déionisée) sur un autre filtre. Cette opération vise à déterminer les blancs de filtres, c'est à dire à déterminer d'éventuelles traces de phosphore contenu dans les filtres. L'utilisation d'eau de mer artificielle vise à observer si les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus avec de l'eau déionisée. La ligne de base se faisant d'après Pujo-Pay et Raimbault (1994) avec de l'eau de mer synthétique (détail des calculs en annexe 9.2).

5.2.2 Résultats

Tableau 6 : Phosphore organique particulaire en station 23 (4 juillet 96) (expérience n°2)

Echantillon	[PO ₄] μmol.l ⁻¹
EMQ + filtre	0,97 (n=1)
EDM artif + filtre	0,94 (n=1)
Prélèvement station 23	2,52 ± 0,02 (n=4)

Blanc de réactif : 0.004 d'absorbance.

5.2.3 Discussion

Les concentrations en phosphate des 2 blancs (EMQ et EDM artif.) sont très élevées. (moyenne de $0,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$ à $\pm 0,01$, cf. tableau 5). Nous nous sommes demandés d'où provenaient ces fortes concentrations en PO_4 dans nos blancs. Il pouvait s'agir d'une contamination par le réactif oxydant, par le filtre, ou par l'eau déionisée.

Concernant l'eau déionisée, le blanc de réactif (0.004 Abs.) nous montre que le mélange réactif n'est pas contaminé mais aussi que l'eau déionisée est bien propre.

5.3 Expérience n°3

5.3.1 Conditions expérimentales

Nous avons repris l'expérience précédente en traitant les filtres à l'acide chlorhydrique à 10 % comme le préconisent Pujo-Pay et Rimbault (1994). Les filtres sont trempés dans de l'acide pendant quelques minutes, rincés à l'eau déionisée puis calcinés pendant 4 heures à 450°C (détail des calculs en annexe 9.3).

Après l'étape d'oxydation humide, nous avons observé la présence de petites particules de filtre dans les flacons des blancs de filtre et d'échantillons. Nous avons alors comparé l'absorbance d'un extrait (EMQ + filtre) brut et celle du même extrait filtré sur un filtre Whatman GF/F de 25 mm de diamètre. L'absorbance avant filtration est de 0,166 et celle après filtration est de 0,093. Ces résultats nous montrent que l'on peut gagner 0,073 unités d'absorbance en rajoutant une étape de filtration avant la lecture au spectrophotomètre.

5.3.2 Résultats

Tableau 7 : Phosphore organique particulaire en station 23 (9 juillet 96) (expérience n°3).

Echantillon	$[\text{PO}_4] \mu\text{mol.l}^{-1}$
EMQ + filtre	0,66 (n=1)
EDM artif + filtre	0,75 (n=1)
Prélèvement station 23	$1,63 \pm 0,06$ (n=4)

Blanc de réactif : 0,004 d'absorbance.

5.3.3 Discussion

D'après le tableau 7, les blancs de filtre sont passés de $(0,95 \pm 0,01) \mu\text{mol PO}_4.\text{l}^{-1}$ à $(0,70 \pm 0,04) \mu\text{mol PO}_4.\text{l}^{-1}$ avec l'opération d'acidification des filtres et la filtration de l'extrait avant le passage au spectrophotomètre. Cependant, ces valeurs restent importantes pour des blancs de filtre.

Nous ne pouvons pas comparer les valeurs obtenues des échantillons d'eau de mer avec celle de la deuxième expérience car même si le prélèvement s'est fait au même endroit, la date de prélèvement n'est pas la même.

5.4 Expérience n°4

5.4.1 Conditions expérimentales

Nous avons repris toujours les mêmes conditions expérimentales avec une calcination des filtres de 12 heures et non de 4 heures comme précédemment. Les échantillons d'eau sont prélevés cette fois au ponton de la baie d'Arue et non à la station 23.

Seul un échantillon de blanc de filtre est préparé avec de l'eau déionisée puisque nous avons vu précédemment et à deux reprises que les résultats obtenus avec de l'eau déionisée et de l'eau de mer artificielle n'étaient pas différents.

En revanche, nous avons préparé deux flacons contenant simplement de l'eau déionisée (sans filtre) afin de définir la part exacte de contamination due au réactif oxydant et la part de contamination due au filtre (détail des calculs en annexe 9.4).

5.4.2 Résultats

Tableau 8 : Phosphore organique particulaire (ponton Arue, 19 juillet 96) (expérience n°4).

Echantillon	[PO ₄] μmol.l ⁻¹ d'extrait	[PO ₄] corrigé μmol.l ⁻¹ d'eau filtrée
EMQ + filtre	0,19 (n=1)	
EMQ (sans filtre)	0,11 ± 0,00 (n=2)	
Prélèvement ponton Arue	12,03 ± 0,05 (n=3)	0,44

Blanc de réactif : 0,004 d'absorbance.

5.4.3 Discussion

La concentration de PO₄ du blanc de filtre a largement diminué (0,19 contre 0,70 μmol.l⁻¹ précédemment). Les résultats du tableau 8 indiquent une contamination de 0,11 μmol.l⁻¹ de phosphore dans le réactif oxydant et de 0,08 μmol.l⁻¹ dans les filtres (0,19 - 0,11).

Les concentrations en PO₄ des échantillons sont fortes (0,44 μmol.l⁻¹), ce qui était attendu en ce site très eutrophisé.

6 Conclusion

6.1 Blancs de filtre

Ces expériences montrent que la contamination par le matériel utilisé, notamment les filtres, peut-être très importante si ce matériel ne subit pas de traitement spécifique et adapté au dosage effectué. De plus, d'éventuelles réactions non contrôlées peuvent intervenir et modifier la valeur obtenue suivant la composition de l'échantillon.

Dans notre cas, nous avons montré qu'une calcination des filtres durant 4h à 450°C n'était pas suffisante. Un minimum de 12 heures de calcination est recommandé. De même, une seconde filtration de l'extrait (échantillon + mélange réactif) sur un filtre Whatman GF/F est vivement conseillée avant la lecture au spectrophotomètre.

Des mesures de POP dans de l'eau de mer se font actuellement au Centre ORSTOM de Nouvelle-Calédonie. Leurs valeurs de blanc de filtre sont : 0,26 ± 0,02 μmol.l⁻¹ (n=6). Pujo-Pay et Raimbault (1994) donnent des valeurs de blanc de filtre de 0,258 ± 0,037 μmol.l⁻¹ (n=17). Notre résultat final de blanc de filtre est de 0,19 μmol/l et est donc tout à fait satisfaisant.

Par ailleurs, il est important de vérifier assez souvent l'efficacité du réactif oxydant par rapport à sa date de préparation. Les expériences ont montré que le réactif oxydant était dégradé au bout de 30 jours de conservation à température ambiante et à l'obscurité.

6.2 Sensibilité de la méthode

Dans les trois premières expériences, la concentration en PO₄ n'est pas corrigée par rapport au volume d'eau de mer filtré et au volume (réactif oxydant + eau déionisée) ajouté à l'échantillon. Les blancs étant trop importants, ces résultats ne sont pas fiables.

La sensibilité de la méthode dépend du volume d'eau filtrée. Si l'on considère qu'une bonne sensibilité est donnée par une absorbance de l'échantillon 5 fois supérieure au blanc, il est nécessaire de filtrer 400 ml d'échantillon à 0,1 mol POP.l⁻¹ pour obtenir une mesure fiable.

6.3 Capacité analytique

Compte tenu du temps de préparation du réactif oxydant et du temps d'oxydation des échantillons, environ 20 dosages de POP sont réalisables par jour. Ce temps d'analyse dépend du matériel à disposition et notamment du nombre de flacons en verre que peut contenir l'autoclave.

Notre résultat en POP (échantillon d'eau lagonaire, prélèvement au ponton de la baie d'Arue) est de $0,44 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour la dernière expérience. Il est intéressant de regarder dans la bibliographie les ordres de grandeurs des résultats obtenus par d'autres laboratoires. Ainsi, Pujo-Pay et Rimbault (1994) trouvent des valeurs de $0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de POP dans l'eau de mer provenant des upwelling de la Mauritanie, et Bell et Elmetri (1995) ont mesuré des concentrations en POP de $0,1$ à $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ dans le lagon de la grande barrière en Australie.

Ces trois milieux sont très différents, il n'est donc pas question de comparer les valeurs, cependant l'ordre de grandeur est identique dans les trois cas.

DENOMBREMENT ET PRODUCTION BACTERIENNE

1 Principe des méthodes

1.1 Dénombrement bactérien

Les dénombrements des effectifs bactériens ont été réalisés par comptage direct de la totalité des cellules bactériennes au moyen de la microscopie en épifluorescence (Hobbie *et al.*, 1977). Les bactéries contenues dans l'échantillon sont concentrées par filtration sur une membrane et colorées à l'aide d'un fluorochrome, le 4',6-diamidino-2 phénylindole dihydrochloride ou DAPI (Porter et Feig, 1980). Il se fixe spécifiquement au niveau de la double hélice de l'ADN entre les paires de bases puriques et pyrimidiques avec lesquelles il établit des liaisons non covalentes formant ainsi un complexe ADN-DAPI. Excité à une longueur d'onde de 365 nm, ce complexe fluoresce en bleu à des longueurs d'ondes supérieures ou égales à 390 nm et rend les bactéries observables par microscopie à épifluorescence.

1.2 Production bactérienne

La vitesse d'incorporation de la thymidine dans l'ADN donne une estimation de son taux de synthèse, donc de la productivité d'un peuplement bactérien (Fuhrman et Azam, 1980). Cette incorporation dans l'ADN nécessite la présence chez les organismes étudiés, d'un mécanisme d'*uptake* et d'une enzyme, la thymidine kinase, catalysant la synthèse de dTMP (desoxy-Thymidine Monophosphate) à partir de la thymidine. La conversion entre la thymidine (TdR) incorporée et les cellules bactériennes produites peut être estimée au moyen de cultures d'eau du lagon. Au cours de ce travail, un facteur de conversion de $0,99.10^{18}$ cellules produites par mole de TdR incorporé (déterminé aux Tuamotu, Torréton et Dufour, 1996) a été utilisé.

2 Dénombrement bactérien

2.1 Prélèvement et échantillonnage

2.1.1 Prélèvement

Les échantillons sont prélevés en sub-surface (-1 m) à l'aide d'une bouteille Niskin, préalablement lavée à l'acide, et transvasés dans des piluliers en polystyrène stériles de 40 ml. Ceux-ci sont stockés en glacière à la température du prélèvement jusqu'à l'analyse, moins de 2 heures après le prélèvement.

2.1.2 Filtration

Les échantillons d'eau sont filtrés sur membrane Nuclepore noire en polycarbonate (de porosité 0,2 μm). Un filtre Whatman GF/F est utilisé comme sous-filtre pour homogénéiser la surface de filtration.

Les volumes d'eau filtrée varient de 5 à 30 ml, suivant le site de prélèvement, de façon à obtenir un nombre suffisant de bactéries par champs lors du comptage au microscope à épifluorescence. L'échantillon est ainsi filtré jusqu'au dernier $\frac{1}{2}$ cm sous faible dépression (<10 cm

de Hg) pour permettre une répartition homogène des bactéries sur le filtre. Puis le DAPI y est ajouté (pour une concentration finale de 10^{-5}g.g^{-1}), afin d'obtenir une bonne coloration, le DAPI est laissé durant au moins 5 minutes avant de terminer la filtration.

Des précautions sont prises pour la manipulation du DAPI (carcinogène), le port de gants est recommandé.

Le filtre sur lequel se sont déposées les bactéries est monté entre lame et lamelle avec de l'huile à immersion non fluorescente (Cargille A ou Olympus).

2.1.3 Conservation

Les lames ainsi obtenues sont numérotées et placées à l'obscurité et à -20°C où elles se conservent plusieurs mois. Des échantillons formolés ne se conservent pas plus de 24 heures en milieu liquide. Au delà, la décroissance bactérienne est nette (Turley, 1993; Talbot, 1995).

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Mode opératoire

Les bactéries sont dénombrées sur une surface de référence à l'aide d'un microscope à épifluorescence (LEITZ-DIALUZ 20, muni d'une lampe à vapeur de mercure de 100 W, d'un oculaire FK 3,3, d'un objectif DAPO 100 UV et d'un miroir dichroïque UV visible). Un bloc sélectif pour l'excitation permet d'observer la fluorescence du DAPI (bleu) sous excitation dans l'UV et la chlorophylle (rouge à orangée) sous excitation dans le bleu. La lame est observée à l'objectif 100 à immersion (grossissement final 1250) et les bactéries sont dénombrées dans des champs choisis sur le réticule en fonction de la densité de la préparation. Ce réticule contient 10×10 carreaux (1 carreau de référence fait $10 \mu\text{m} / 10 \mu\text{m}$). Les bords supérieurs et droits sont choisis arbitrairement comme faisant partie des champs. Le dénombrement s'effectue sur environ 400 bactéries autorisant ainsi une précision théorique d'environ 10% (Kirchman *et al*, 1982). Le déplacement de la lame est réalisé de façon aléatoire.

2.2.2 Calcul, expression des résultats

Le diamètre intérieur de la tourelle est de 1,523 cm, et correspond donc à $1,82.10^8 \mu\text{m}^2$, soit $1,82.10^6$ carreaux de $10 \mu\text{m} / 10 \mu\text{m}$. L'abondance totale (A, en bactéries par litre) est donc déterminée par :

$$A = (N / C) \times 1,82.10^6 \times 1000 / V$$

avec

- N : le nombre total de bactéries comptées,
- C : le nombre total de carreaux observés (nombre de champs x nombre de carreaux par champs),
- V : le volume d'eau filtré en ml.

Le même calcul est appliqué pour dénombrer les cyanobactéries, les flagellés autotrophes, les flagellés hétérotrophes ainsi que les bactéries.

Les cellules dénombrées en milieu lagunaire et océanique sont petites (volume moyen $< 0,05 \mu\text{m}^3$). Dans cette classe de taille, Lee et Fuhrman (1987) suggèrent d'utiliser un contenu en carbone de 20 fgC/cellule.

3 Production bactérienne déterminée par incorporation de Thymidine

3.1 Prélèvement et échantillonnage

Le prélèvement se fait de la même façon que pour le dénombrement bactérien.

3.2 Mode opératoire

10 ml d'eau du lagon sont incubés immédiatement après l'arrivée au laboratoire avec de la thymidine tritiée (TdR*, Amersham, 46 Ci/mmol) à une concentration finale de 10 nM pendant 60 min. à 30°C.

La réaction est arrêtée avec 0,5 ml de formol (à 30% tamponné au Borate de sodium, contenant de la thymidine non marquée à 10 mM).

L'échantillon est alors filtré sur une membrane Whatman (en nitrate de cellulose de 0,2 µm de porosité) préalablement saturée avec 0,5 ml de thymidine non marquée (10 mM + formol 0,5%). Puis 10 ml d'acide trichloro-acétique ou TCA (5% + thymidine non marquée 1 mM) sont laissés 15 min. en contact avec le filtre. Le support et le filtre sont rincés 4 fois avec 5 ml de TCA. Un dernier rinçage avec 2 ml d'éthanol permet d'éliminer la TdR* mobilisée dans les éléments lipidiques (Wicks et Robarts, 1987).

Le filtre est ensuite transféré dans une fiole à scintillation et reçoit 0,5 ml de TCA. Les fioles sont placées 30 min. dans un bain-marie à 100°C afin d'hydrolyser l'ADN et de limiter l'auto-absorption des rayonnements β⁻ (Torréton et Bouvy, 1991). Après refroidissement, les échantillons reçoivent 0,75 ml d'acétate d'éthyle pour dissoudre le filtre, puis 10 ml de liquide scintillant (Aquasol-2 de NEN Research Products). Des témoins sont effectués en ajoutant le formol avant la TdR* et sont traités de manière identique.

Des précautions sont prises lors des manipulations de la thymidine tritiée en utilisant des gants. Les déchets solides (gants, tubes etc...) sont jetés dans un conteneur spécial.

Le comptage définitif des échantillons et des témoins est effectué le lendemain afin de limiter les effets de la chimioluminescence. Le compteur à scintillation (Packard TRI-CARB 1000 liquid scintillation analyzer) convertit automatiquement les coups par minute (cpm) en désintégrations par minute (dpm) au moyen d'un standard externe. Les dpm comptées sur les blancs sont soustraites des dpm obtenues sur les échantillons.

3.3 Calcul, expression des résultats

L'incorporation de la thymidine tritiée (TdR inc.) exprimée en mol/l/h est calculée de la manière suivante :

$$\text{TdR inc.} = (\text{dpm} / 2.2 \cdot 10^{12}) / \text{AS} \times (1000 / \text{V}) \times (60 / \text{t})$$

avec

- dpm : différence entre dpm de l'échantillon et dpm du blanc,
- $2.22 \cdot 10^{12}$: nombre de dpm par Ci,
- AS : activité spécifique du traceur (Amersham : AS = 46000) en Ci/mol,
- V : volume d'échantillon en ml,
- t : durée d'incubation en min.

La production bactérienne de cellules est estimée par :

$$\text{Prod (cell.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \text{TdR inc.} \times 0,99 \cdot 10^{18} \text{ (cell.mol}^{-1}\text{ incorporé)}$$

La production bactérienne en gC est estimée par :

$$\text{Prod (gC.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} = \text{Prod (cell.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} \times 20 \text{ (fgC.cell}^{-1}\text{)}$$

Le temps de génération (TR) des bactéries est calculé à partir de l'abondance (A) et de la production bactérienne :

$$\text{TR (heure)} = \text{A (cell.l}^{-1}\text{)} / \text{Prod (cell.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$$

La capacité analytique est d'environ 10 échantillons par jour pour le dénombrement bactérien seul et 5 échantillons par jour pour le dénombrement des cyanobactéries, des flagellés autotrophes, des flagellés hétérotrophes et des bactéries. Il faut compter une journée pour mesurer la production bactérienne sur 40 échantillons.

4 Résultats *in situ*

Les dénombrements bactériens et le dosage de la production bactérienne ont été effectués sur les prélèvements d'eau des 23 stations Antropic du mois d'avril 96. Les résultats sont en annexe 7.

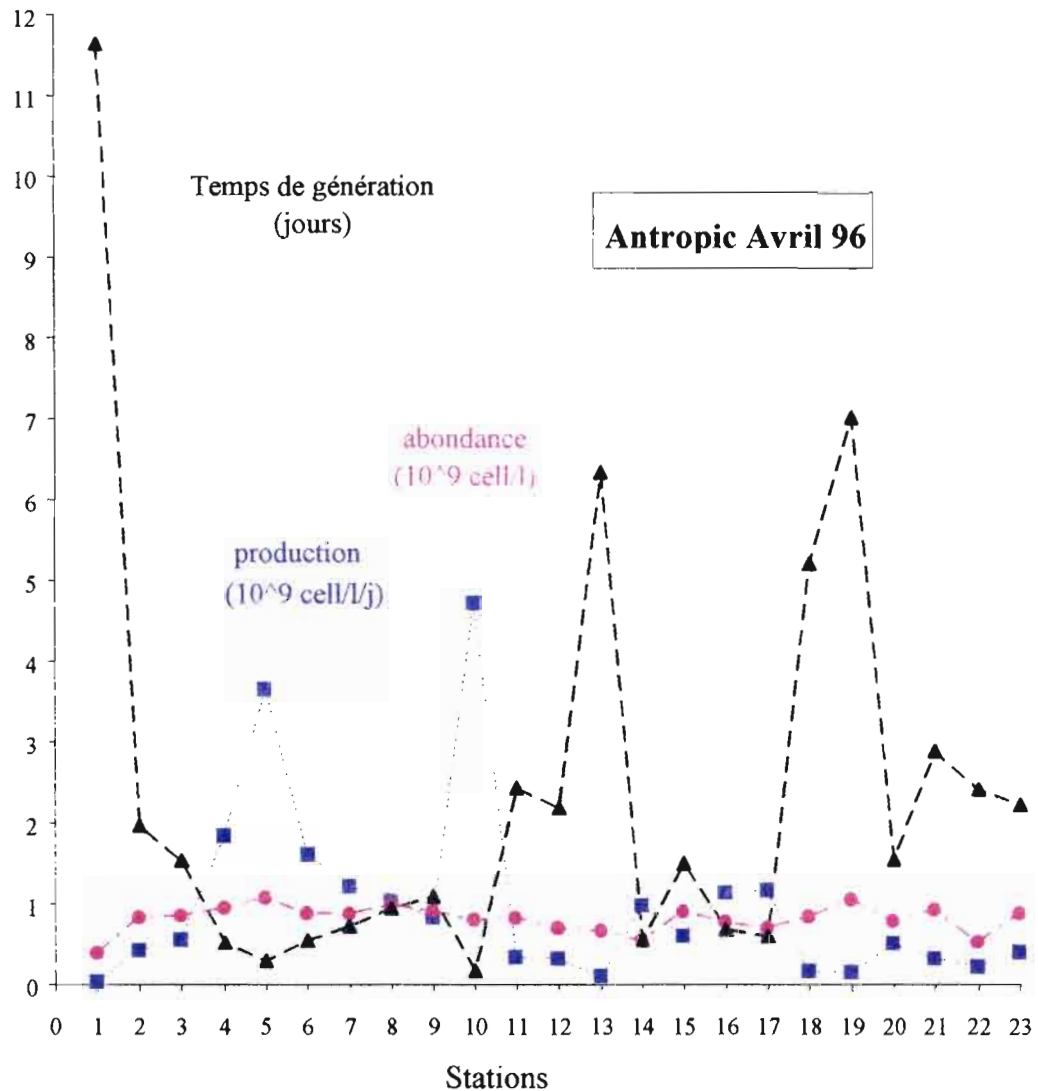


Figure 16 : Temps de génération, production et abondance bactérienne pour le mois d'avril 96 sur les 23 stations Antropic.

Les résultats de la figure 16 nous montrent que l'abondance bactérienne varie très peu par rapport à la production bactérienne. En effet, le profil d'abondance est très régulier, la station 5 (port), la plus riche, présente une abondance de $1,1 \cdot 10^9$ bactéries. l^{-1} contre $0,4 \cdot 10^9$ bactéries. l^{-1} pour la station 1 (océanique), soit à peine 3 fois plus.

Les écarts de production bactérienne sont beaucoup plus significatifs. Ainsi, la station 1 présente un minimum de $0,03 \cdot 10^9$ bactéries. $l^{-1} \cdot j^{-1}$ contre $3,65 \cdot 10^9$ bactéries. $l^{-1} \cdot j^{-1}$ en station 5 (port), soit 120 fois plus. Le maximum (160 fois plus que la station 1) est obtenu en station 10 (fond de baie, près de la rivière Papeava).

Les stations présentant de fortes productions bactériennes (stations 5 et 10), présentent de très faibles temps de génération (0,3 et 0,2 jours respectivement), ce qui est caractéristique des milieux côtiers. Les bactéries y sont nombreuses et se reproduisent très rapidement. Pour la station océanique (station 1), un temps de renouvellement de 12 jours est obtenu, valeur comparable à celle donnée par Carlson et Ducklow (1992) de 16 jours, dans un milieu comparable (zone oligotrophe de l'océan Indien Tropical).

MESURE DE LA SALINITE

1 Principe de la méthode de mesure

La conductivité de l'eau de mer est assurée par les ions présents. Du fait de la proportionnalité des concentrations des différents sels dissous (loi de Dittmar) la conductivité permet de déterminer la salinité avec une grande précision.

Le salinomètre utilisé est un salinomètre à induction, avec compensation électronique de température (AUTOLAB, model 601 MK III). Un transformateur T1 alimenté par un oscillateur à fréquence élevée crée un champ électrique induit dans un anneau d'eau de mer. Le courant induit crée à son tour aux bornes du secondaire du transformateur T2 une tension que l'on amplifie et détecte. Par le circuit électrique reliant T2 à T1, on crée un contre-courant annulant la tension induite, dont on déduit la conductivité de l'eau de mer. La résistance RT compense les effets de température à ± 3 °C (Aminot et Chaussepied, 1983).

2 Prélèvement et échantillonnage

L'eau est prélevée en sub-surface (-1 m) à l'aide d'une bouteille Niskin, transvasée dans des flacons en plastique de 250 ml à double bouchon (hermétique), pour éviter toute évaporation. Les flacons se conservent à température ambiante à l'obscurité pendant plusieurs mois.

3 Mode opératoire

3.1 Etalonnage de l'appareil

Le calcul de la salinité se fait par comparaison entre le rapport de conductivité de l'Eau Normale à celle de l'échantillon. L'étalonnage est réalisé avec de l'Eau de Mer Normale (Standard Sea-Water), préparée à l'Institut of Oceanographic Sciences de Wormley en Grande-Bretagne et dont la chlorinité est connue à $\pm 0,001$. La cellule du salinomètre à induction (type YEO-KAL, Model 602 Mk11) est rincée à 2 reprises, on remplit alors complètement l'ampoule d'Eau de Mer Normale en évitant l'introduction de bulles d'air.

Le potentiomètre d'étalonnage est ajusté pour que la valeur lue sur l'appareil corresponde au rapport de conductivité de l'Eau de Mer Normale (une lecture instable peut avoir pour origine la présence de microbulles). L'heure à laquelle est effectuée la mesure est notée. Ce réglage n'est pas touché pour le reste des mesures.

L'appareil est étalonné par rapport à la température de l'échantillon standard. Il est important que les températures de la pièce et surtout des échantillons restent stable pendant toute la période de mesure.

3.2 Analyse des échantillons

La même opération effectuée pour l'Eau de Mer Normale est répétée avec les échantillons. Si l'on veut obtenir la précision maximale sans effectuer un nombre de rinçages excessif, il faut éviter de passer à la suite des échantillons dont les salinités diffèrent de plus de 1 à 2 ‰.

3.3 Calcul de la salinité

Une correction doit être appliquée aux rapports de conductivité fournis par l'appareil : la correction de la dérive. Celle-ci est estimée à l'aide d'échantillons d'eau passés à intervalles réguliers.

Le rapport de conductivité ainsi corrigé de la dérive est le rapport R_t mesuré à la température t .

Connaissant R_t , on en déduit la salinité selon l'Echelle pratique de salinité 1978, EPS 78 (Aminot et Chausseped, 1983).

$$S = a_0 + a_1 R_t^{0.5} + a_2 R_t + a_3 R_t^{1.5} + a_4 R_t^2 + a_5 R_t^{2.5} + \frac{(t - 15)}{1 + k(t - 15)} (b_0 + b_1 R_t^{0.5} + b_2 R_t + b_3 R_t^{1.5} + b_4 R_t^2 + b_5 R_t^{2.5})$$

avec $a_0 =$	0,0080	$b_0 =$	0,0005	$k =$	0,0162
$a_1 =$	- 0,1692	$b_1 =$	- 0,0056		
$a_2 =$	25,3851	$b_2 =$	- 0,0066	$\Sigma a_i =$	35,0000
$a_3 =$	14,0941	$b_3 =$	- 0,0375		
$a_4 =$	- 7,0261	$b_4 =$	0,0636	$\Sigma b_i =$	0,0000
$a_5 =$	2,7081	$b_5 =$	- 0,0144		

4 Résultats des mesures sur les échantillons Antropic

Les mesures de salinité des échantillons Antropic provenant des prélèvements mensuels d'eau de mer sur les 23 stations sont effectuées en routine. La capacité analytique est d'environ 20 échantillons par heure. Les résultats obtenus sont en annexe 8.

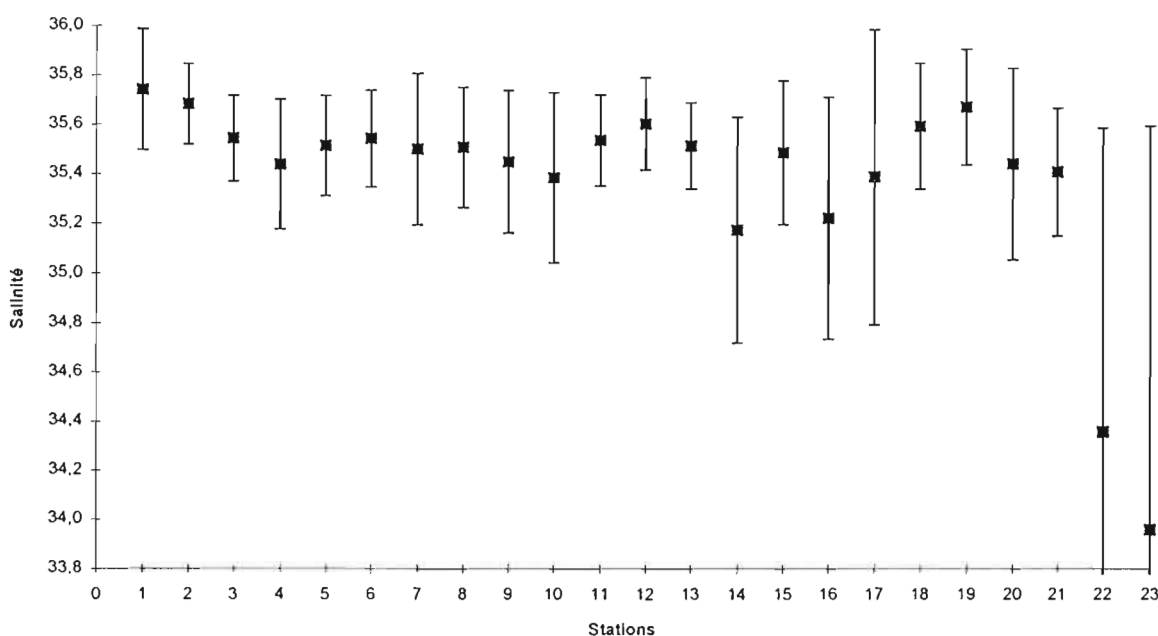


Figure 18 : Répartition de la salinité (moyenne de novembre 95 à juillet 96 et écarts types).

En faisant abstraction des stations 22 et 23, on observe des valeurs de salinité variant de 35,18 pour la station 14 à 35,75 pour la station océanique (figure 18).

Les résultats obtenus pour les deux dernières stations sont très faibles. On observe une dilution des eaux lagunaires par rapport aux eaux océaniques (station 1). Cette dilution est due aux apports d'eau douce. En effet, la station 22 se trouve juste devant l'embouchure de la rivière Nahoata, ce qui explique sa faible valeur (34,35). Les écarts types sont très élevés en raison des fortes variations des précipitations au cours des neuf mois de mesure.

CONCLUSION

Au cours de ce stage de 4 mois, plusieurs techniques ont été abordées (dosage de la chlorophylle, dosage de phosphore organique particulaire, dénombrement bactérien, production bactérienne et mesure de salinité).

J'ai tout d'abord observé que la capacité analytique journalière des différentes analyses était un facteur important à prendre en compte avant de commencer un travail. En effet, il est nécessaire d'avoir un plan d'organisation rigoureux en fonction du nombre d'échantillons à analyser, de la durée limitée de la conservation des échantillons et de l'analyse elle-même.

Ensuite, en étudiant plusieurs méthodes de dosage de la chlorophylle de façon plus approfondie, dans trois compartiments différents (colonne d'eau, matériel particulaire et sédiment), il s'est avéré qu'une méthode n'était pas toujours applicable pour un milieu étudié. En effet, suivant les caractéristiques du milieu, des adaptations ou des modifications peuvent ou doivent être nécessaires. Ainsi, pour le dosage de la chlorophylle dans la colonne d'eau, la fluorimétrie semble la technique la plus intéressante de par sa grande sensibilité et le méthanol s'est révélé être le solvant d'extraction le plus efficace. En revanche, pour le dosage de la chlorophylle dans le sédiment, la spectrophotométrie donne des valeurs supérieures par rapport à celles obtenues par fluorimétrie et l'utilisation de l'acétone semble plus intéressante.

De plus, les tests de conservation des unités de filtration Millex pour le dosage de la chlorophylle ont montré que ces supports étaient faciles d'utilisation et qu'ils pouvaient être conservés dans des conditions rudimentaires. Une conservation de deux mois sous-estimerait la concentration initiale de la chlorophylle d'environ 25% à température ambiante et d'environ 15% à +4°C.

Pour le dosage du phosphore organique particulaire, les premières étapes nécessaires à la mise au point méthodologique ont révélé que les moyens analytiques devaient être adaptés aux éléments à doser. Ainsi, en calcinant les filtres 12 heures au lieu de 4 et en effectuant une filtration de l'extrait avant la lecture au spectrophotomètre, une diminution d'absorbance sur les blancs de filtre de 77% est observée. Cette diminution autorise une mesure fiable du POP avec 400 ml d'eau filtrée pour des concentrations de l'ordre de 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Il n'était évidemment pas possible au cours de ce stage de résoudre tous les problèmes méthodologiques rencontrés pour chaque méthode. Un compromis a été recherché entre la variété des méthodes employées et les améliorations méthodologiques pouvant être apportées.

Le technicien supérieur, responsable de la « qualité » des résultats se doit donc de maîtriser parfaitement un mode opératoire. Ceci implique de vérifier à chaque étape l'adéquation du protocole employé. Cette condition nécessaire n'est cependant pas suffisante, il doit contrôler également les autres étapes de l'analyse, du prélèvement au traitement des données. Enfin, il doit s'assurer de la fiabilité et de la justesse de ces résultats en s'appuyant sur des données accessibles dans la littérature.

Ce stage m'a, en résumé, permis d'acquérir une expérience en laboratoire de recherche, d'y apprécier le travail au sein d'une équipe et de me sensibiliser aux aspects de la sécurité.

Enfin, ce stage de fin d'étude m'a apporté, en plus des connaissances techniques développées dans ce rapport, un contrat de travail au centre ORSTOM de Tahiti pour une durée de un an.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMINOT A. & CHAUSSEPIED M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO (eds.), Brest, 395 p.
- BELL R.F. & ELMETRI I., 1995. Ecological indicators of Large-scale eutrophication in the Great Barrier Reef Lagon. *AMBIO*, Royal Swedish Academy of Sciences (eds), Suisse, **24**, 208-215.
- CARLSON C.A. & DUCKLOW H.W., 1992. Oceanic bacterial production. *Advances in Microbiol. Ecology*, **12**, 113-181.
- CHAVEZ F.P. and others, 1995. On the chlorophyll *a* retention properties of glass-fiber GF/F filters. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 428-433.
- DANDONNEAU Y., 1982. A method for the rapid determination of chlorophyll plus phaeopigments in samples collected by merchant ships. *Deep-Sea Res.*, **29**, 647-654.
- DICKSON M.L. & WHEELER P.A., 1993. Chlorophyll *a* concentrations in the Nord Pacific : Does a latitudinal gradient exist ?. *Limnol. Oceanogr.*, **38**, 1813-1818.
- FUHRMAN J.A. & AZAM F., 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 1085-1095.
- GARRIGUE C & DI MATTEO A., 1991. La biomasse végétale benthique du lagon sud-ouest de Nouvelle Calédonie. *Archives Sciences de la Mer*, ORSTOM, Biologie Marine, **1**, 129 p.
- HOBBIE J.E., DALEY R.S. & JASPER S., 1976. Use of nucleopore for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228.
- IVANOFF A., 1972. Introduction à l'océanographie, propriétés physiques et chimiques des eaux de mer. VUIBERT (eds.), Paris, (tome 1), 208 p.
- JACQUES G. & TREGUER P., 1986. Ecosystèmes pélagiques marins. MASSON (eds.), Paris, *collection d'écologie 19*, 243 p.
- KIRCHMAN D.L., SIGDA J., KAPUSCINSKI R. & MITCHELL R., 1982. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 376-382.
- LEE S. & FUHRMAN J.A., 1987. Relations ships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1298-1303.
- LORENZEN, C.J., 1966. A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, **13**, 223-227.
- LORENZEN, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and pheopigment : spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 343-346.
- NEVEUX J., DELMAS D., ROMANO J.C., ALGARRA P., IGNATIADES L., HERBLAND A., MORAND P., NEORI A., BONIN D., BARBE J., SUKENIK A. & BERMAN T., 1990. Comparison of chlorophyll and phaeopigment determinations by spectrophotometric, fluorometric, spectrofluorometric and HPLC methods. *Marine Microbial Food Webs.*, **4**, 217-238.

- PARSONS T.R., MAITA Y. & LALLI C.M., 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. PERGAMON PRESS (eds.), Paris, 173 p.
- PORTER K.J. & FEIG Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- PUJO-PAY M. & RAIMBAULT P., 1994. Improvement of wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology*, **105**, 203-217.
- PUJO-PAY M., 1995. L'azote et le phosphore en milieu marin, importance des formes organiques en milieu océanique du large. *Th. de doctorat*, Océanologie, Univ. de la Méditerranée, 164 p.
- TALBOT V., 1996. Activité protéolytique et dynamique bactérienne en Océan Austral. *Th. de doctorat*, Océanologie, Univ. de la Méditerranée, 194 p.
- TORRETON J.P. & BOUVY M., 1991. Estimating bacterial DNA synthesis from [³H]thymidine incorporation : discrepancies among macromolecular extraction procedures. *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 299-306.
- TORRETON J.P. & DUFOUR P., 1996. Bacterioplankton production determined by DNA synthesis, protein synthesis and frequency of dividing cells in Tuamotu atoll lagoons and surrounding ocean. *Microb. Ecol.*, (in press).
- TURLEY C.M., 1993. Direct estimates of bacterial numbers in seawater sample seawater sample without incurring cell loss due to sample storage. In : *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr & J.J. Cole (eds), Lewis, Boca Raton, 143-147.
- VYHNALEK V., 1994. Determination of chlorophyll *a* in fresh waters using the whole-water technique. *Journal of Plankton Research*, **16**, 795-808.
- WICKS R.J. & ROBERTS R.D., 1987. The extraction and purification of DNA labelled with [*methyl*-³H]thymidine in aquatic bacterial production studies. *J. Plankton Res.*, **9**, 1159-1166.
- YENTSCH, C. S., 1967. The measurement of chloroplastic pigments. Thirty years of progress ?, 225-270, in H. C. GOLTERMAN et R. S. GLYMO (eds), *Chemical environment in the aquatic habitat*. Noord-Hollandsche Uitgevers, Amsterdam.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout particulièrement :

F.X. Bard qui est à l'origine de ma venue en Polynésie Française ; ainsi que l'ensemble du personnel du centre ORSTOM de Tahiti : administratifs, techniciens, stagiaires, VATs et chercheurs.

Nicolas Maihota et Joël Orempuller pour leur disponibilité lors des sorties en mer.

Vincent Talbot pour son suivi et sa patience,
Jean Pagès et Jean-Pascal Torréton pour leurs nombreux conseils et pour avoir été mes guides scientifiques au cours de ce stage.

Et enfin, Pierre Harris pour son dynamisme à toute épreuve, sa disponibilité et le soutien moral qu'il m'a apporté tout au long de ce stage.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche Synthétique Programme ANTROPIC

OBJECTIFS

Le programme Antropic cherche à identifier les relations entre les modifications des conditions de milieu provoquées par l'activité humaine et l'évolution des peuplements dans les milieux coralliens. Nous nous intéresserons plus spécifiquement aux processus d'eutrophisation et d'hypersédimentation qui sont reconnus comme étant parmi les principales sources d'altération en milieu corallien. Le travail de recherche prévu pour 1995 cherchera à définir les conditions du milieu sur le système récifo-lagonaire de Tahiti à déterminer l'impact de ces conditions de milieu sur les peuplements en place et enfin à replacer l'évolution de l'environnement dans un contexte historique récent.

CONTEXTE

Le développement économique des pays de la zone tropicale est responsable de modifications majeures de l'environnement côtier. Les écosystèmes coralliens bien adaptés aux eaux océaniques oligotrophes sont particulièrement sensibles aux modifications de la turbidité et de la charge en éléments nutritifs des eaux. Dans le cas des îles hautes, en raison du faible temps de résidence des eaux lagonaires, ces perturbations se traduisent généralement par un remplacement des peuplements de coraux par des peuplements à base de macroalgues. Les bilans qui ont été dressés démontrent que ces altérations ont une répartition qui concerne l'ensemble de l'océan mondial et que la forte synergie qui existe entre les phénomènes naturels ou anthropique aussi bien à l'échelle globale que régionale doit être prise en compte.

FINALITES

En terme de développement les implications de ce programme de recherche concernent directement les populations et les pouvoirs politiques du Territoire de Polynésie Française mais elles s'inscrivent bien évidemment dans un contexte «géoscientifique» beaucoup plus général. Les perturbations anthropiques sont de plus en plus clairement perçues par les responsables du développement économique comme une menace à moyen terme sur la santé de l'écosystème récifal et donc aussi sur son potentiel financier. En terme d'application, la mise au point d'un outil de diagnostic est indispensable si l'on envisage de lutter contre les altérations existantes ou potentielles de l'environnement.

REALISATION

Les études envisagées peuvent être découpés en 3 étapes complémentaires

1 - Etude des peuplements benthiques de substrats meubles (macrofaune) et de substrats durs (coraux, macroalgues), recherche d'espèces ou d'assemblages spécifiques.

2 - Etude sur un an des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement (masse d'eau, sédiment, apports continentaux).

3 - Cartographie sédimentaire et apports particuliers à l'interface eau-sédiment. Analyse du matériel sédimentaire en tant qu'archives historiques des conditions d'environnement pendant le siècle dernier (métaux, dérivés des lignines, pigments, hydrocarbures, isotopes stables, etc.).

La mise en commun de ces résultats permettra de rechercher des espèces ou des groupements d'espèces pouvant être utilisés comme bioindicateurs des perturbations anthropiques. L'étude des archives sédimentaires permettra de replacer la situation actuelle dans un contexte historique et de prévoir les tendances évolutives.

PARTICIPANTS

Chercheurs ORSTOM : R. Fichez (responsable), J. Pagès, J.-P. Torréton, P. Frouin, P. Harris, V. Talbot

Chercheurs associés : A. Arnoux (Univ., Marseille), C. Badie (LESE-CEA), G. Cauwet (CNRS, Banyuls), J.M. Fernandez (CEA), M. Fontugne (CFR-CNRS, Gif), C. Hily (CNRS), C. Payri (Univ., Papeete), A. Saliot (Univ., Paris VI).

Collaborations étrangères : J. Brodie (GBRMPA, Austr.), G. Brunskill (AIMS, Austr.), G. Gold-Bouchot (CINVESTAV, Mexique), P. Hutchings (Museum, Austr.), D. Klumpp (AIMS, Austr.), K. Woolfe (Univ. J. Cook, Austr.).

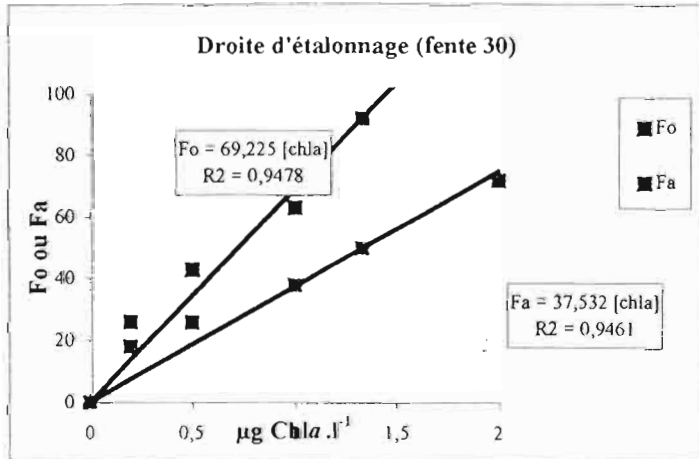
Assistance technique ORSTOM : L. Chungue, R. Jouen, N. Maihota, J. Orepuller, J. Paoaafaite, J. Teuri.

ECHEANCES

Déroulement du programme prévu de début 1995 à fin 1996. Au-delà de cette échéance le programme ANTROPIC se prolongera au travers du programme ECOTROPE de l'ORSTOM (UR16) sur les écosystèmes côtiers tropicaux.

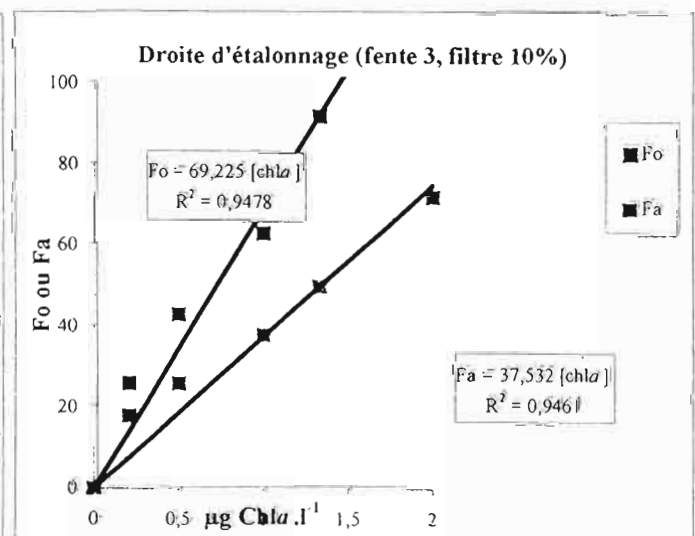
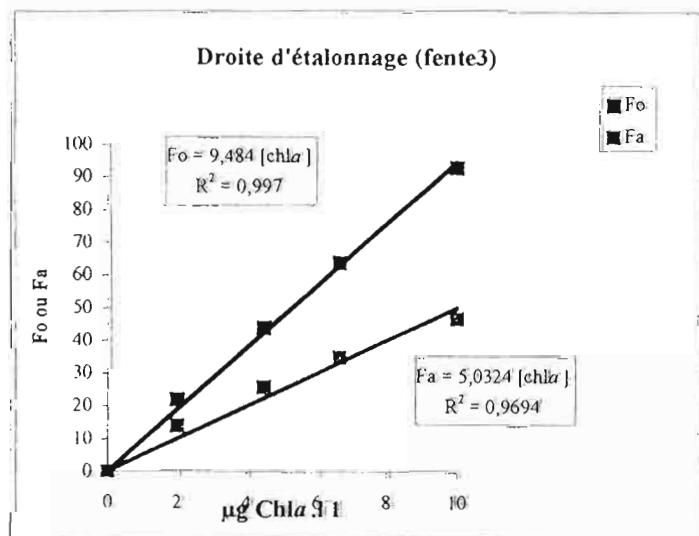
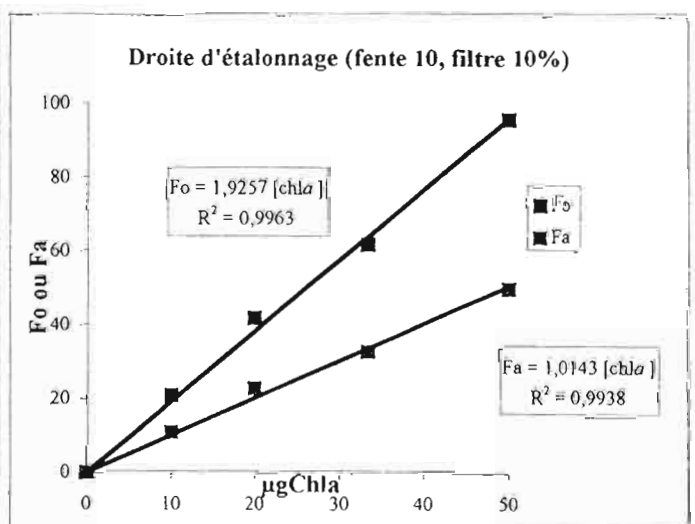
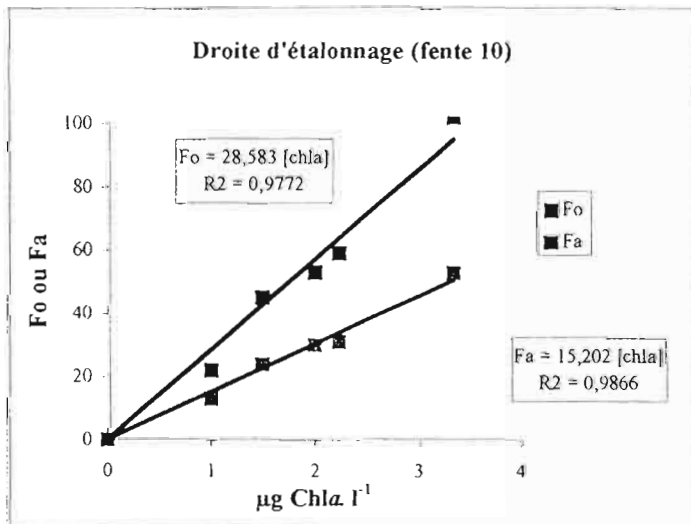
Annexe 2 : Calibration du fluorimètre.

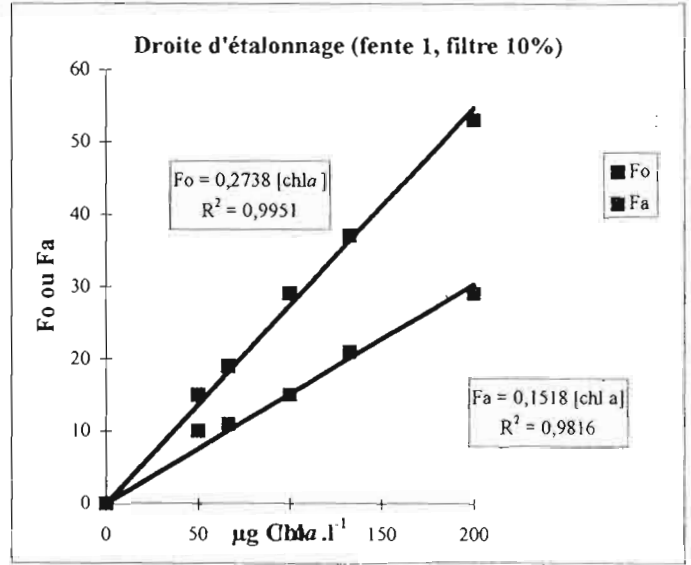
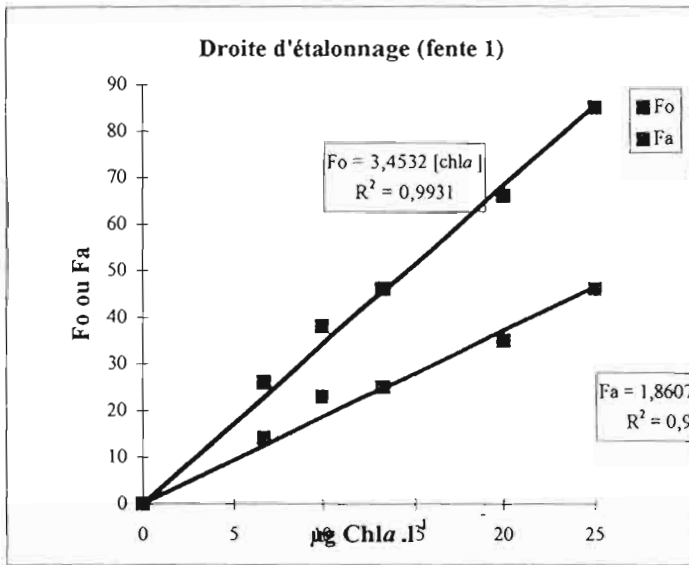
1^{er} solvant d'extraction: méthanol



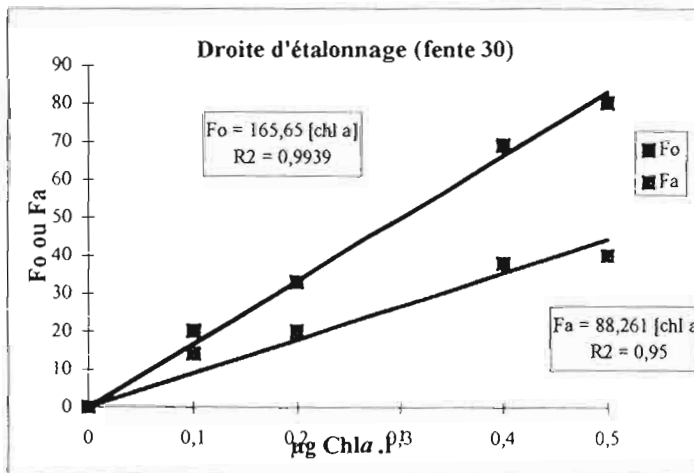
Fente	Ko	Ka
30	69,23	37,53
10	28,58	15,20
3	9,48	5,03
1	3,42	1,86

Filtre 10 %		
Fente	Ko	Ka
10	1,93	1,01
3	0,76	0,39
1	0,27	0,15

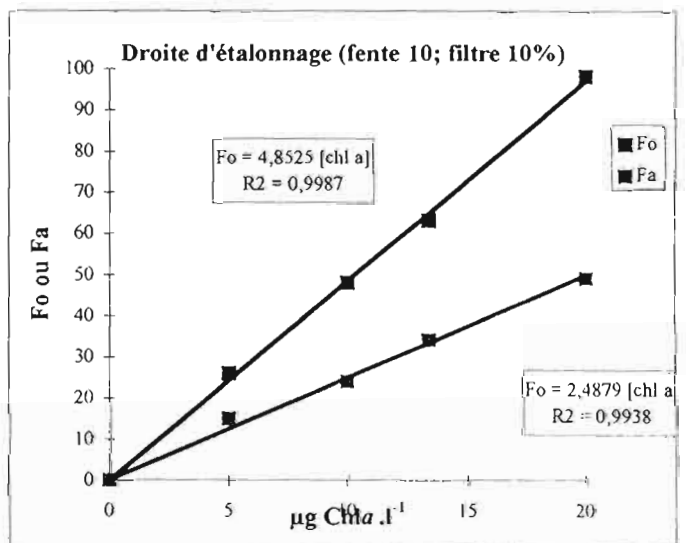
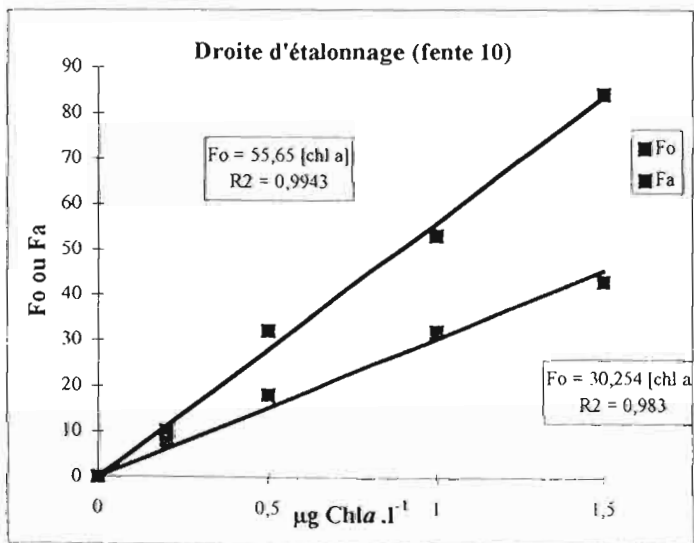


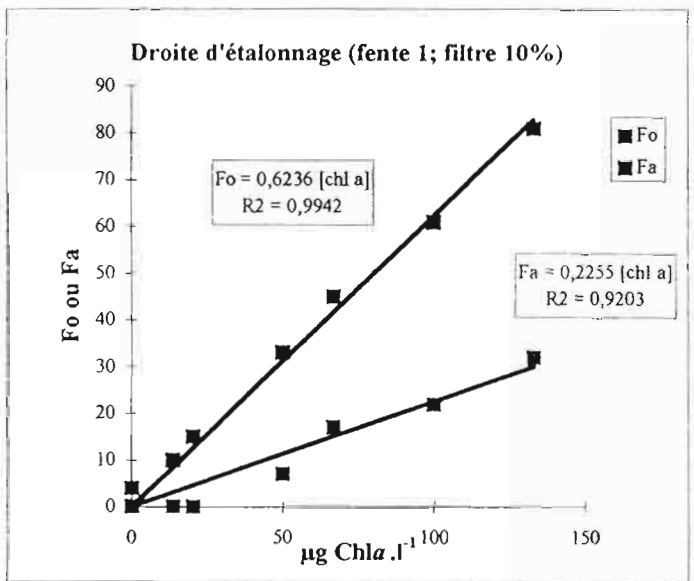
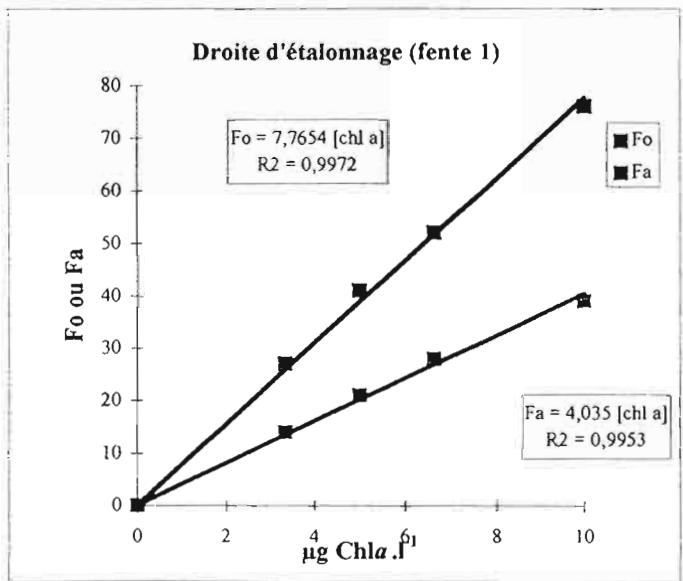
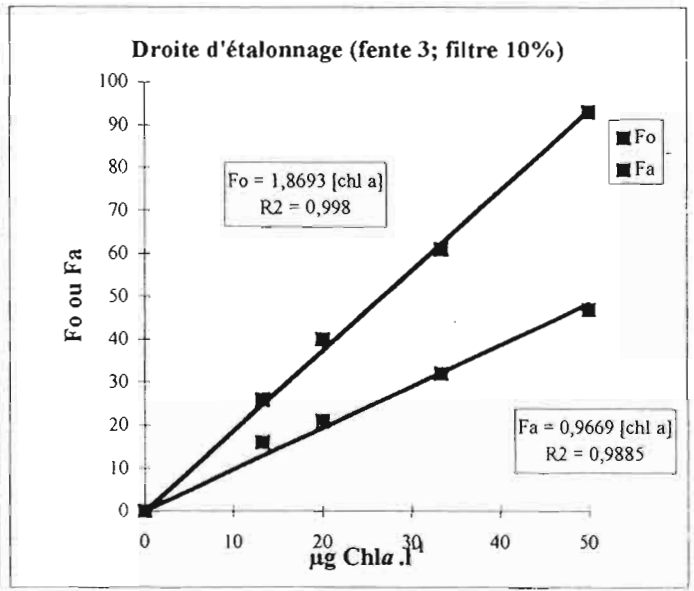
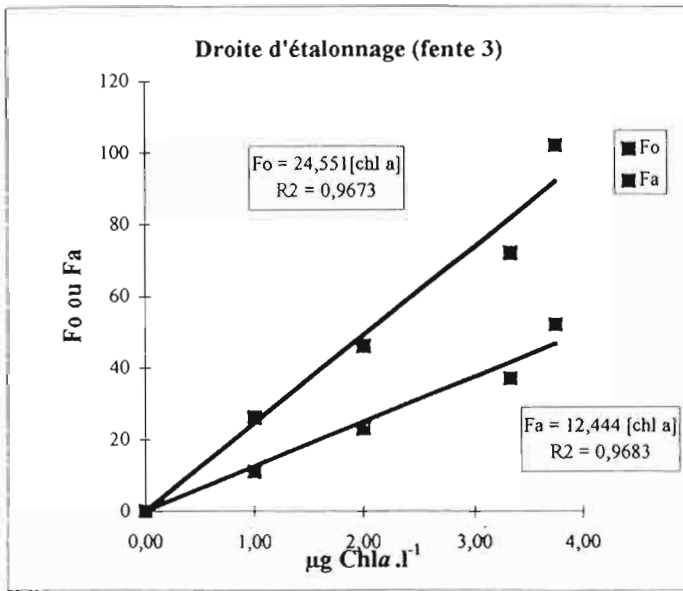


2^{ème} solvant d'extraction: acétone



Fente	Ko	Ka
30	165,65	88,26
10	55,65	30,25
3	22,24	11,20
1	7,77	4,04
Filtre 10 %		
Fente	Ko	Ka
10	4,85	2,49
3	1,87	0,97
1	0,62	0,31





Annexe 3 : Chlorophylle *a* totale (en µg/l) dans la colonne d'eau.

Station	Sep-95	Oct-95	Nov-95	Dec-95	Jan-96	Feb-96	Mar-96	Apr-96	May-96	Jun-96
1	0,54	0,24	0,39	0,38	0,30	0,49	2,30	nd	0,59	0,66
2	0,71	1,08	0,60	0,94	1,11	0,73	1,90	nd	0,52	0,99
3	4,35	0,76	0,61	0,70	0,91	0,67	2,29	0,79	0,49	0,78
4	1,12	1,46	0,52	0,82	1,08	1,08	2,24	1,05	0,53	1,22
5	1,79	1,58	1,08	1,55	1,61	1,35	2,24	1,67	0,85	2,46
6	1,36	1,52	1,20	1,46	1,73	1,58	5,28	1,58	0,97	2,28
7	1,36	1,73	1,20	1,70	2,06	1,32	2,18	1,54	1,00	2,28
8	0,95	1,73	1,32	1,70	2,14	1,43	1,65	1,51	1,20	1,81
9	2,34	1,76	1,09	1,95	2,05	1,52	1,52	1,58	0,97	1,81
10	1,16	1,00	1,58	1,85	1,52	1,35	0,79	1,35	1,09	1,64
11	1,07	1,35	1,46	1,61	1,70	1,46	1,87	0,93	1,09	1,76
12	0,81	0,88	1,10	1,56	1,64	1,14	1,76	0,81	1,20	1,64
13	0,76	0,85	0,57	0,71	1,17	0,67	1,52	0,74	2,34	1,03
14	2,31	0,85	0,79	0,82	1,29	0,71	1,40	1,03	1,93	0,99
15	0,83	0,76	0,91	1,46	1,29	0,85	1,07	1,93	1,03	1,03
16	1,93	0,82	0,35	1,95	1,52	0,70	1,87	1,07	1,24	1,22
17	2,04	0,39	0,56	0,40	0,62	0,74	1,35	0,79	0,66	0,76
18	1,10	0,40	0,54	0,30	0,57	0,81	1,07	0,68	0,79	0,72
19	0,76	0,34	0,50	0,29	0,52	0,68	1,58	0,91	0,74	0,81
20	1,10	0,32	0,64	0,42	0,79	0,66	1,52	0,79	1,01	0,89
21	1,29	0,32	0,60	0,62	0,67	0,62	1,70	1,01	0,87	0,89
22	1,32	0,39	0,64	0,46	0,75	0,68	1,81	1,08	1,18	0,89
23	4,83	0,37	0,68	0,41	0,76	0,68	1,76	1,05	0,93	0,87

Annexe 3' : Pourcentage de chlorophylle *a* active (en %) dans la colonne d'eau.

Station	Sep-95	Oct-95	Nov-95	Dec-95	Jan-96	Feb-96	Mar-96	Apr-96	May-96	Jun-96
1	51	72	64	70	44	63	78	nd	67	56
2	56	58	57	57	57	54	79	nd	50	53
3	42	61	56	57	62	59	72	38	49	40
4	46	68	57	48	61	58	74	57	56	65
5	40	73	64	68	70	54	69	69	51	54
6	57	65	61	63	77	59	54	63	62	52
7	46	73	61	70	73	60	81	57	63	52
8	65	71	60	70	66	60	63	60	55	51
9	49	68	67	59	55	61	61	54	57	51
10	64	50	63	62	57	54	53	54	67	52
11	57	69	68	69	58	59	71	57	57	57
12	60	49	70	53	65	58	72	51	64	52
13	58	62	48	41	68	44	61	42	48	49
14	40	58	68	60	57	50	66	51	34	53
15	50	57	62	53	57	51	70	58	58	60
16	48	61	60	68	61	57	60	58	66	63
17	46	42	55	36	37	48	64	47	37	47
18	42	65	49	51	41	51	72	58	39	52
19	50	49	57	57	48	49	71	39	45	41
20	53	61	48	50	68	57	78	53	52	54
21	49	58	51	50	64	57	58	46	56	57
22	45	66	59	41	53	45	69	40	61	54
23	40	58	65	68	69	58	72	50	59	58

nd = non déterminé, échantillon perdu .

Annexe 4 : Chlorophylle *a* totale (en µg/l) dans le matériel particulaire.

Station	Sep-95	Oct-95	Nov-95	Dec-95	Jan-96	Feb-96	Mar-96	Apr-96	May-96	Jun-96
1A	160,98	21,95	42,44	37,32	36,94	41,84	83,36	28,50	30,87	25,85
1B	201,96	20,49	45,37	34,39	36,94	41,84	77,58	26,39	28,50	25,85
1C	292,89	nd	39,51	32,20	36,94	40,57	74,41	28,15	29,29	21,46
2A	277,06	42,22	29,27	24,88	48,82	36,61	77,58	31,71	25,33	30,24
2B	277,06	43,54	25,61	22,44	43,54	29,69	75,99	29,76	21,37	33,66
2C	300,81	43,54	23,42	27,32	48,82	29,29	87,08	29,27	22,96	32,68
3A	57,07	38,26	35,61	34,83	38,00	55,41	342,31	38,05	26,91	22,96
3B	48,29	29,27	47,50	32,46	41,95	52,25	91,57	37,07	27,71	25,51
3C	65,86	36,59	40,90	36,41	41,95	46,70	73,25	37,07	28,50	22,96
4A	190,76	20,98	39,58	44,64	22,56	40,37	65,68	32,46	26,12	26,91
4B	197,12	23,42	48,82	114,78	26,12	41,16	70,73	33,25	23,75	24,54
4C	221,29	22,44	44,86	102,91	23,35	41,95	65,68	34,83	30,08	26,91
5A	61,47	17,74	31,66	17,81	11,08	26,12	64,41	33,47	10,55	14,25
5B	49,89	41,39	31,66	14,64	11,08	30,08	68,20	32,21	23,15	17,02
5C	36,41	19,87	30,08	24,54	12,67	26,34	46,73	30,94	18,10	10,55
6A	40,98	22,10	34,30	29,29	19,39	46,37	53,05	32,46	18,52	20,21
6B	43,90	22,93	32,98	23,35	18,60	44,10	3,68	38,00	17,68	22,31
6C	83,42	nd	32,98	32,68	46,18	35,62	3,68	41,95	19,37	16,00

Notes

nd = non déterminé, échantillon perdu .

Station 3A en mars 96 = Valeur aberrante.

Station 4 en décembre 95 = Problème de prélèvement dans le piège à particule.

Station 6 en mars 96 = Problème de prélèvement dans le piège à particule.

Annexe 4' : Pourcentage de chlorophylle α active (en %) dans le matériel particulaire

Station	Sep-95	Oct-95	Nov-95	Dec-95	Jan-96	Feb-96	Mar-96	Apr-96	May-96	Jun-96
1A	41	38	45	42	34	39	52	36	49	34
1B	44	38	44	34	34	42	36	44	50	36
1C	42	nd	40	39	34	46	46	45	48	36
2A	48	30	31	35	29	35	41	33	45	35
2B	48	29	36	42	32	32	42	33	40	36
2C	47	25	32	42	29	39	43	32	33	35
3A	23	29	40	41	32	37	92	33	32	37
3B	21	32	30	29	34	40	66	34	27	37
3C	25	33	42	34	31	36	69	37	36	37
4A	37	37	40	30	40	28	55	38	40	39
4B	44	33	42	39	43	32	57	40	36	38
4C	43	34	42	32	40	25	52	38	31	42
5A	43	36	33	37	38	29	53	28	45	43
5B	40	17	30	35	47	28	48	38	37	42
5C	35	40	34	25	41	31	61	37	37	39
6A	36	52	37	45	53	38	54	44	44	50
6B	34	31	52	48	46	40	57	45	54	54
6C	24	nd	48	39	48	37	60	49	44	54

Notes

nd = non déterminé, échantillon perdu .

Station 3A en mars 96 = Valeur aberrante.

Annexe 5 : Chlorophylle *a* totale (en µg/g) dans le sédiment.

Carotte C			
<i>méthanol</i>			<i>acétone</i>
prof. (cm)	spectro.	fluo.	fluo.
8	0,62	0,95	1,22
8	0,77	1,04	0,92
8	0,69	0,93	1,45
15	1,10	1,28	0,53
15	1,11	1,38	0,63
15	0,70	0,97	0,81
22	0,98	1,12	0,92
22	0,60	0,84	0,70
22	0,48	0,56	0,57
30	0,25	0,27	0,87
30	0,21	0,23	1,32
30	0,08	0,12	1,15
38	0,82	0,76	0,65
38	0,86	0,78	0,75
38	0,73	0,72	0,67
42	0,69	0,60	0,46
42	0,63	0,55	0,66
42	0,66	0,55	0,68
45	0,56	0,61	0,74
45	0,58	0,70	0,63
45	0,57	0,59	0,82
50	0,37	0,41	1,03
50	0,70	0,70	1,04
50	0,66	0,63	0,88

Carotte B			
<i>méthanol</i>			<i>acétone</i>
prof. (cm)	spectro.	fluo.	fluo.
9	1,46	1,75	2,10
9	1,33	1,84	1,25
9	2,10	2,85	1,44
17	0,63	1,01	1,64
17	0,90	1,34	1,42
17	0,78	1,17	2,41
24	0,82	1,38	2,07
24	0,99	1,17	1,75
24	0,82	1,23	1,39
32	0,50	0,86	1,08
32	0,45	0,71	0,96
32	0,68	0,74	0,16
39	0,23	0,25	0,93
39	0,25	0,27	0,88
39	0,17	0,22	0,62
48	0,15	0,15	0,27
48	0,17	0,22	1,12
48	0,16	0,20	0,34
54	0,13	0,19	0,50
54	0,17	0,16	0,97
54	0,13	0,20	0,66
62	0,34	0,31	0,96
62	0,50	0,47	0,84
62	0,31	0,32	0,59

Annexe 5' : Chlorophylle *a* totale (en $\mu\text{g/g}$) dans le sédiment.

Carotte A <i>Acétone</i>		
prof. (cm)	spectro.	fluo.
9	0,99	1,09
9	1,20	1,34
9	0,94	1,23
18	1,60	1,83
18	0,88	1,00
18	0,95	0,96
27	0,72	0,74
27	0,55	0,54
27	0,66	0,65
36	0,20	0,51
36	0,68	0,68
36	0,58	0,54
45	0,67	0,61
45	0,74	0,66
45	0,99	0,92
54	0,76	0,62
54	1,12	0,86
54	0,82	0,60
61	0,89	0,65
61	0,87	0,64
61	0,79	0,58
67	1,10	0,75
67	0,77	0,62
67	nc	nc

Carotte B <i>Acétone</i>		
prof. (cm)	spectro.	fluo.
1	4,02	3,73
1	nc	5,47
1	5,86	4,41
2	2,73	3,30
2	2,27	5,05
2	5,33	3,91
3	2,86	2,87
3	2,69	2,66
3	2,65	2,54
4	2,74	2,60
4	4,43	3,55
4	2,27	2,25
5	2,14	2,16
5	3,03	2,82
5	4,65	2,36
6	3,30	2,79
6	3,32	2,99
6	2,96	2,66
7	2,33	2,18
7	1,84	1,88
7	2,32	2,24
8	2,59	2,52
8	2,35	2,21
8	3,22	2,69

Carotte C <i>Acétone</i>		
prof. (cm)	spectro.	fluo.
1	nc	3,94
1	4,79	5,09
1	4,84	4,57
2	3,30	2,88
2	2,20	2,51
2	2,39	2,63
3	2,22	2,40
3	2,54	2,49
3	2,97	nc
4	1,67	1,79
4	2,95	2,72
4	2,81	2,66
5	2,10	2,81
5	1,25	1,50
5	1,24	1,49
6	1,23	1,45
6	2,12	2,04
6	2,15	2,39
7	0,82	1,00
7	1,35	1,49
7	1,19	1,33
9	0,64	0,83
9	0,73	0,90
9	0,92	1,05

Carotte D <i>Acétone</i>		
prof. (cm)	spectro.	fluo.
10	1,27	1,52
10	1,07	1,34
10	1,21	1,39
19	1,19	1,80
19	0,64	0,86
19	0,50	0,68
26	0,41	0,49
26	0,34	0,47
26	0,22	0,36
33	0,65	0,90
33	0,85	1,03
33	0,78	0,99
40	0,33	0,48
40	0,44	0,78
40	0,44	0,76
47	0,31	0,64
47	0,20	0,35
47	0,28	0,65
54	0,03	0,20
54	0,06	0,22
54	0,08	0,16
61	0,31	0,59
61	0,29	0,53
61	0,18	0,45

Annexe 6 : Protocole du dosage du P.O.P.

DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE PARTICULAIRE

1. Principe

Le dosage consiste à collecter sur une membrane Whatman GF/F toutes les particules supérieures à 0,7 μm contenues dans l'eau de l'échantillon en filtrant l'eau. Le phosphore présent dans le matériel particulaire recueilli est oxydé grâce à l'action conjuguée du persulfate de potassium et de la température (Pujo-Pay et Raimbault, 1994). Le phosphore minéral (ions orthophosphates) est alors mesuré par colorimétrie selon la méthode classique de Murphy et Riley (1962) modifiée par Koroleff (1976).

2. Domaine d'application

La précision de la méthode dépend du volume filtré. Si on filtre 250 ml d'échantillon et que l'on extrait dans 22,5 ml de réactif, le facteur de concentration est de 11. La limite de détection pour le dosage étant en théorie autour de 0,02 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Raimbault, comm. pers.), la limite de détection du POP doit être au mieux de 0,02 / 11 soit 0,0018 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

3. Prélèvement, échantillonnage

Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une bouteille NISKIN préalablement lavée à l'eau acidifiée (HCl 10 %). L'eau de mer est transvasée dans des bidons en polyéthylène (capacité de 5 litres), préalablement rincés avec de l'eau acidifiée (HCl 10 %) pour enlever toute trace de matière organique. On prendra garde à rincer plusieurs fois le bidon avec l'eau à analyser avant de le remplir.

4. Conservation

Il n'existe pas de procédé pleinement satisfaisant de conservation prolongée des échantillons d'eau pour le dosage du phosphore organique particulaire. L'eau doit être filtrée le plus rapidement possible. Les filtres se conservent pendant plusieurs mois au congélateur (-20 °C).

5. Appareillage

- Autoclave
- Banc de filtration
- Spectrophotomètre (type : MILTON ROY Spectronic 1201) équipé de cuve de mesure en quartz de 5 cm de trajet optique
- Filtres GF/F Whatman (25mm)
- Flacons en verre boro-silicaté de 50ml (type : Schott GL 32) et bouchons en polypropylène résistants aux conditions de cuisson (120 °C, 1 h). Les bouchons en bakélite sont à proscrire car ils se déforment et se fendent au bout de quelques cuissons.

6. Réactifs

- Acide chlorhydrique (10%)
- Persulfate de Potassium
- Acide Borique

- Soude (1.5M)
- Paramolybdate d'Ammonium
- Acide Ascorbique
- Oxytartrate de Potassium et d'Antimoine
- Acide sulfurique
- Dihydrogénophosphate de potassium anhydre

6.1. Préparation du réactif oxydant

- 15g de Persulfate de Potassium
- 7,5g d'Acide Borique
- 70ml de NaOH (1.5M) soit 60g/l, Merck 6498
- on complète à 250ml avec de l'eau milliQ.

Ce réactif ne se conserve pas plus de 5 jours à l'abri de la lumière et à température ambiante (Raimbault, comm. pers.).

6.2. Préparation du réactif phosphate

- 15 g de Paramolybdate d'Ammonium dans 500ml d'eau distillée.
- 140 ml d'Acide Sulfurique (d=1.84) dans 900ml d'eau distillée puis laisser refroidir (mettre la préparation dans une bouteille en verre brun.).
- 54 g d'Acide Ascorbique dans 500ml d'eau distillée puis placer la solution au frais.
- Dissoudre 0,34 g d'Oxytartrate de Potassium et d'Antimoine (III) dans 250 ml d'eau distillée et placer cette solution au frais.

6.3. Mélange réactif (pour 40 échantillons) :

- 20 ml de Molybdate
- 50 ml d'Acide sulfurique
- 20 ml d'Acide ascorbique
- 10 ml d' Oxytartrate.

Ce mélange réactif ne se conserve pas plus de 6 h et doit être préparé immédiatement avant chaque série d'analyses (Aminot et Chaussepied, 1983).

7. Mode opératoire

7.1. Préparation des filtres :

On utilise les filtres GF/F Whatman (ϕ 25 mm) passés dans l'acide chlorhydrique (10%). Ces filtres sont rincés une fois en filtrant 25ml d'eau milliQ. Ils sont séchés à l'étuve pendant 8 heures (60 °C), puis calcinés à 450 °C pendant 12 heures. Ils sont ensuite pliés dans du papier aluminium préalablement calciné (450 °C, 12 h). Les filtres sont finalement numérotés puis pesés.

7.2. Filtration :

Cf. Analyse de Matière en suspension.

7.3. Réaction à blanc dans les flacons :

On réalise une oxydation humide à blanc dans les flacons de mesure pour éliminer toute trace éventuelle de matière organique qui fausserait les résultats. Dans chaque flacon, on place 20 ml d'eau milliQ auxquels on ajoute 2,5 ml de réactif oxydant (composition cf. paragraphe 6.1.)

Les flacons sont placés à l'autoclave pendant 1 heure à 120 °C.

7.4. Préparation des échantillons :

600 ml environ d'échantillon d'eau sont filtré sur une membrane Whatman GF/F préalablement préparée. Les filtres sont ensuite placés dans les flacons prétraités. 20 ml d'eau milliQ plus 2,5ml de réactif oxydant sont ajoutés. Les flacons sont enfin placés 1 heure à l'autoclave (120°C).

Remarque : Si le dosage des ions orthophosphate ne peut se faire immédiatement, les échantillons doivent être mis au réfrigérateur.

7.5. Dosage des ions orthophosphate :

20 ml d'échantillon reçoivent 2,5ml du mélange réactif (paragraphe 6.3). Après 15 minutes et juste avant la lecture au spectrophotomètre (à 885 nm), les échantillons sont filtrés. On supprime ainsi une grande partie de l'absorbance due à la désagrégation du filtre Whatman.

Etalonnage : pour la gamme étalon, utiliser des concentrations de 1, 2, 5 et 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de KH_2PO_4 .

8. Calcul, expression des résultats

L'absorbance nette de l'échantillon est calculée par $A = A_{\text{tr}} - b_{\text{r}} - b_{\text{f}}$
avec :

- A_{tr} : absorbance mesurée pour l'échantillon traité,
- b_{r} : absorbance mesurée pour le blanc de réactif,
- b_{f} : absorbance mesurée pour le blanc de filtre.

La concentration de PO_4 corrigée en $\mu\text{mol/l}$ d'eau de mer en fonction du volume d'eau de mer qui a été filtré (V) et du volume de réactif oxydant (v) est donnée par la relation :

$$[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{corrigée}} (\mu\text{mol.l}^{-1}) = P * A * (v/V).$$

P est la pente de la droite d'étalonnage en $\mu\text{mol.l}^{-1}$ par unité d'absorbance.
A est l'absorbance nette à 885 nm.

Annexe 7 : Pico et nanoplancton - Antropic avril 1996.

Site	station	Bactéries totales 10^6 ml^{-1}	Bactéries fixées 10^3 ml^{-1}	Particules 10^3 ml^{-1}	% fixées	Bactéries fixées/ particule	Cyano- bactéries 10^6 ml^{-1}	Flagellés autotrophes 10^3 ml^{-1}	Flagellés hétérotrophes 10^3 ml^{-1}	Production bactérienne $10^9 \text{ cell.l}^{-1} \text{ j}^{-1}$	Temps de génération jours
Océan	1	0,390	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,03	11,63
lagon	2	0,830	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,42	1,96
lagon	3	0,851	13	14	1,5	0,9	0,029	1,6	13,3	0,56	1,53
lagon	4	0,951	13	15	1,3	0,8	0,057	6,6	20,6	1,84	0,52
lagon	5	1,071	20	29	1,9	0,7	0,082	6,3	11,7	3,65	0,29
lagon	6	0,885	26	27	3,0	1,0	0,072	4,3	18,0	1,62	0,55
lagon	7	0,878	35	22	4,0	1,6	0,062	6,6	15,1	1,21	0,72
lagon	8	0,984	39	28	4,0	1,4	0,074	5,8	17,7	1,04	0,95
lagon	9	0,910	13	19	1,4	0,7	0,057	3,1	22,7	0,83	1,09
lagon	10	0,801	42	20	5,3	2,1	0,037	2,8	16,5	4,72	0,17
lagon	11	0,821	12	12	1,4	1,0	0,043	1,6	15,9	0,34	2,43
lagon	12	0,697	15	10	2,2	1,5	0,045	1,7	17,0	0,32	2,18
lagon	13	0,665	10	6	1,5	1,6	0,020	0,7	25,0	0,10	6,33
lagon	14	0,545	31	23	5,6	1,3	0,036	2,3	21,8	0,98	0,56
lagon	15	0,901	29	14	3,3	2,1	0,051	4,9	18,4	0,60	1,50
lagon	16	0,778	33	19	4,3	1,7	0,037	6,1	17,2	1,14	0,68
lagon	17	0,697	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,17	0,60
lagon	18	0,840	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,16	5,20
lagon	19	1,047	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,15	7,01
lagon	20	0,785	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,51	1,54
lagon	21	0,919	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,32	2,88
lagon	22	0,524	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,22	2,41
lagon	23	0,877	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,40	2,22

nd : non déterminé

les comptages de flagellés autotrophes ne sont donnés qu'à titre indicatif en raison de leur faible abondance.

Annexe 8 : Mesure de salinité.

Station	Nov-95	Dec-95	Jan-96	Feb-96	Mar-96	Apr-96	May-96	Jun-96	Jul-96
1	35,78	35,66	35,60	35,47	35,46	nd	36,22	35,74	36,01
2	35,77	35,69	35,58	35,38	35,58	nd	35,80	35,72	35,96
3	35,81	35,45	35,60	35,43	35,34	35,34	35,78	35,44	35,71
4	35,24	35,38	35,15	35,26	35,13	35,65	35,79	35,48	35,87
5	35,54	35,46	35,40	35,23	35,22	35,49	35,81	35,73	35,74
6	35,57	35,43	35,32	35,29	35,37	35,62	35,83	35,59	35,86
7	35,45	34,84	35,43	35,37	35,41	35,64	35,96	35,53	35,87
8	nd	35,13	35,34	35,30	35,39	35,65	35,79	35,56	35,89
9	35,42	35,26	35,33	35,27	34,91	35,61	35,95	35,55	35,73
10	35,33	35,48	35,32	35,24	35,20	34,66	35,92	35,52	35,78
11	35,60	35,24	35,27	35,40	35,51	35,65	35,75	35,61	35,77
12	35,72	35,52	35,39	35,33	35,38	35,65	35,79	35,83	35,80
13	35,71	35,49	35,52	35,32	35,34	35,66	35,81	35,27	35,49
14	nd	35,40	35,21	35,01	34,17	34,92	35,75	35,50	35,43
15	35,64	35,37	35,25	35,25	34,91	35,56	35,83	35,79	35,75
16	34,60	35,31	35,39	35,45	35,20	34,25	35,90	35,70	35,19
17	35,89	35,77	35,58	35,45	35,40	33,78	35,76	35,47	35,38
18	35,91	35,49	35,07	35,45	35,37	35,65	35,76	35,80	35,84
19	35,93	35,66	35,26	35,48	35,39	35,66	35,95	35,78	35,90
20	35,25	35,55	35,07	35,45	35,22	34,80	35,62	36,16	35,82
21	35,36	35,55	35,32	35,01	35,06	35,65	35,74	35,71	35,23
22	35,79	35,19	34,54	34,68	34,80	35,61	31,69	33,72	33,18
23	35,76	35,69	33,67	30,14	33,30	34,12	35,21	34,61	33,13

nd = non déterminé, échantillon perdu .

Annexe 9.1: Phosphore Particulaire le 2 juillet 96.

Gamme étalon

[PO4] (µM) Abs. Abs. corrigée

0,5	0,052	0,049
1	0,11	0,107
5	0,513	0,51
10	1,039	1,036

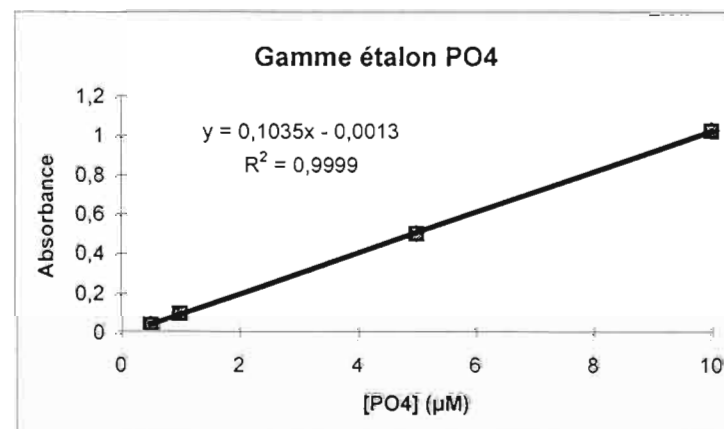
Eau de mer filtrée : 300 ml

Blanc : 0,003

Mélange eau déionisée + reactif oxydant : (50+5) ml

Résultat échantillon

	Absorb.	[PO4] µM	Moyenne	sigma
EMQ+filtre	0,148	1,41		
EMQ+filtre	0,238	2,28		
EdM artif.	0,154	1,47		
	0,142	1,36	1,41	0,05
échant.	0,165	1,58		
échant.	0,151	1,44		
échant.	0,104	0,99		
échant.	0,169	1,62		
échant.	0,164	1,57		
échant.	0,165	1,58	1,56	0,22
échant.+étal	0,284	2,73		
échant.+étal	0,272	2,61	2,67	0,06



moy (µmol/l EdM)

0,03

Annexe 9.2 : Phosphore Particulaire le 4 juillet 96.

Eau de mer filtrée : 600 ml

Blanc : 0,004

Mélange eau déionisée + reactif oxydan (20+2.5) ml

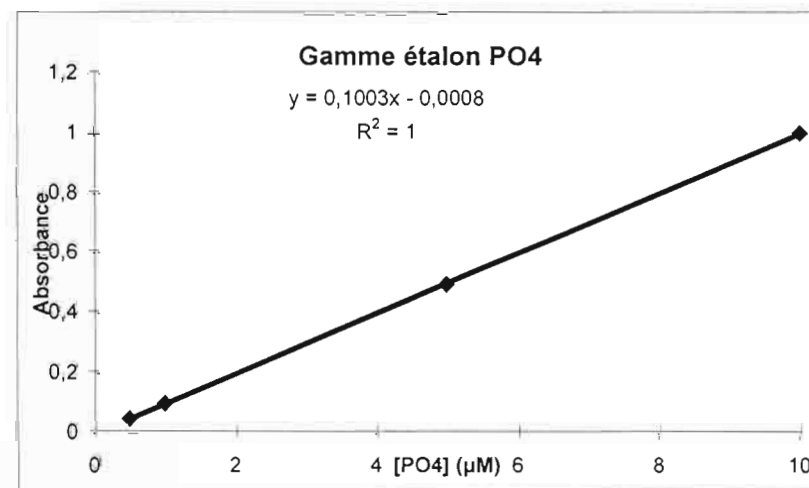
Gamme étalon
[PO₄] (μM) Abs.

Abs. corrigée

0,5	0,054	0,05
1	0,105	0,101
5	0,501	0,497
10	1,008	1,004

Résultat échantillon

Absorb.	[PO ₄] μM	Moyenne	sigma
EMQ+filtre	0,096	0,97	
EdM artif.	0,093	0,94	0,015
échant.	0,249	2,49	
échant.	0,253	2,53	
échant.	0,255	2,55	
échant.	0,251	2,51	0,022
échantillon + étalon interne (1.106 μ	0,01	0,01	
	0,391	3,91	
	0,377	3,77	0,07



moy (μmol/l EdM)
0,06

Annexe 9.3 : Phosphore Particulaire le 9 juillet 96.

Eau de mer filtrée : 600 ml

Blanc : 0,004

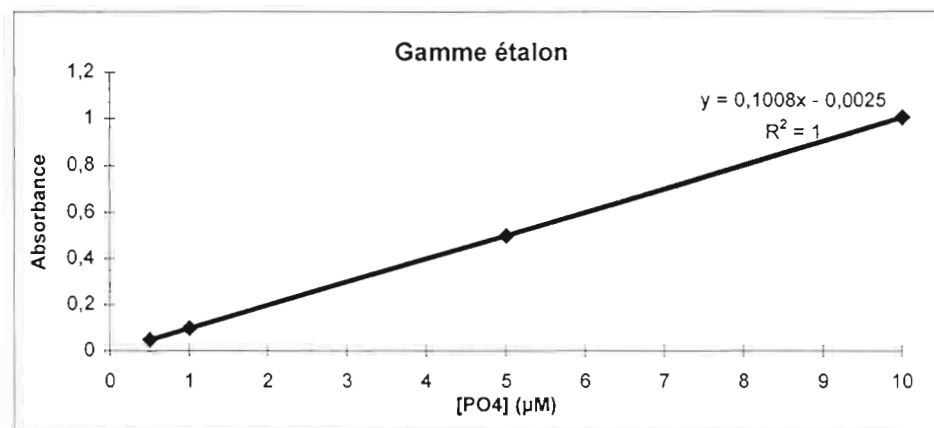
Mélange eau déionisée + reactif oxydant : (20+2.5) ml

Gamme étalon

[PO4] (µM)	Abs.	Abs. corrigée
0,5	0,052	0,048
1	0,103	0,099
5	0,504	0,5
10	1,01	1,006

Résultat échantillon

	Absorb.	[PO4] µM	Moyenne	sigma
EMQ+filtre	0,064	0,66		
EdM artif.	0,073	0,75	0,70	0,045
échant.	0,155	1,56		
échant.	0,159	1,60		
échant.	0,17	1,71		
échant.	0,165	1,66	1,63	0,06



moy (µmol/l EdM)
0,03

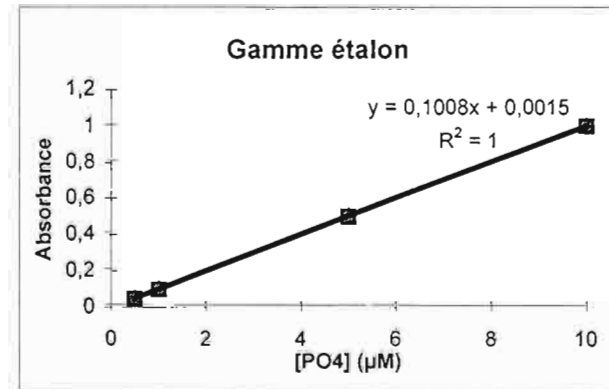
échantillon + étalon interne (0.91 µM)

	0,284	2,84		
	0,307	3,07	2,96	0,11

Annexe 9.4 : Phosphore Particulaire le 19 juillet 96.

Eau de mer filtrée : 600 ml
 Blanc : 0,004
 Mélange eau déionisée + reactif oxydant : (20+2.5) ml

Gamme étalon		
[PO4] (µM)	Abs.	Abs. corrigée
0,5	0,046	0,042
1	0,093	0,089
5	0,492	0,488
10	0,989	0,985



	Résultat échantillon			dilution	moy (µmol/l EdM)		
	Absorb.	Abs. corrigée	[PO4] µM		[PO4] µ	Moyenne	sigma
EMQ+filtre	0,021	0,017	0,19		0,19		
EMQ	0,013	0,009	0,11		0,11		
EMQ	0,012	0,008	0,10		0,10	0,11	0,005
échant.	0,611	0,607	6,05	2	12,093		
échant.	0,605	0,601	5,99	2	11,974		
échant.	0,607	0,603	6,01	2	12,014	12,03	0,049
échantillon + étalon interne (1.106 µM)							
	0,630	0,626	6,24	2	12,47		
	0,630	0,626	6,24	2	12,47	12,47	0,000

moy (µmol/l EdM)
 0,44

Résumé

Ce stage s'inscrit dans le cadre des programmes de recherche ANTROPIC et PGRN-2 développés au Centre ORSTOM de Tahiti (Polynésie française). Plusieurs analyses ont été réalisées au cours de ce stage d'océanographie : analyse de la chlorophylle, du phosphore organique particulaire, abondance et activité bactériennes, mesure de salinité. Le travail réalisé a comporté une partie bibliographique, une partie de terrain (prélèvements et observations) et une importante partie au laboratoire.

Le cœur de ce travail a consisté à la mise au point méthodologique du dosage de phosphore organique particulaire par oxydation humide au persulfate de potassium et du dosage de la chlorophylle-*a* totale dans différents compartiments: colonne d'eau, matériel particulaire et sédiments.

Ainsi, pour la colonne d'eau, le dosage de la chlorophylle-*a* totale par fluorimétrie reste la méthode de référence, le méthanol étant le solvant d'extraction le plus intéressant. Pour le sédiment, la spectrophotométrie et l'acétone paraissent cette fois être respectivement la méthode et solvant d'extraction le plus intéressant. Enfin, des tests de conservation d'unités de filtration Millex pour le dosage de la chlorophylle ont montré que ce support était parfaitement adapté à des conditions expérimentales rudimentaires et qu'ils étaient faciles d'utilisation.

Les résultats acquis au cours des 4 mois de stage ont montré qu'un mode opératoire n'est pas applicable à tous les milieux. Si ce mode opératoire reste la phase analytique prépondérante, la fiabilité des données nécessite de la part du technicien une maîtrise de l'ensemble des opérations d'une analyse, des prélèvements aux traitements des données.

Mots-clés: chlorophylle *a*, phosphore organique particulaire, abondance bactérienne, production bactérienne salinité

Abstract

The work realised during this training period take place into the scientist research programs ANTROPIC and PGRN-2 which are developed in ORSTOM Institute of Tahiti (French Polynesia). Many analyses have been made during this training period : chlorophyll, particulate organic phosphorus, bacterial abundance and bacterial production, salinity measurements. The work has included a bibliography period, a fieldwork period (sampling and observations) and a significant laboratory period

The core of this work has consisted in adjustment of the methodology for quantity determination of particulate organic phosphorus by means of wet oxidation with potassium persulfate and for quantity determination of chlorophyll-*a* in various compartments : seawater, particulate material and sediments.

Then, in the case of seawater, the quantity determination of chlorophyll-*a* by means of the fluorimetric method is still the reference method, and methyl alcohol is the most interesting extracting solvent. In the case of sediments, the spectrophotometric method and acetone seem to be the most interesting method and extracting solvent. Finally, the conservation experiences made with sterilising filter unit type Millex for chlorophyll analyses, have shown that this filters perfectly suit the rudimentary and experimental conditions of the experiences and that they were easy to use

Experiment results on a 4 month period have shown that an operating method is not available for all environments. And even if the operating method remains the preponderant analytical phase, the reliability of data requires for technician a whole control of the different parts of an analyse, starting with sampling up to data processing

Key-words: chlorophyll *a*, particulate organic phosphorus, bacterial abundance, bacterial production, salinity