

Correction de la diffusion pour l'établissement de spectres d'absorption par des cultures d'algues microscopiques

Pierre Armand ROGER et Pierre Adrien REYNAUD
*O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Microbiologie,
Centre de Dakar, B.P. 1386, Dakar, Sénégal.*

RÉSUMÉ

L'exposition de cultures d'algues à de fortes intensités lumineuses provoque une décoloration totale (bleaching).

Ce phénomène est utilisé pour obtenir le spectre de diffraction de particules d'algues et corriger le spectre d'absorption pigmentaire de cultures cassées à la French cell press.

MOTS CLÉS : Algues - spectres d'absorption - techniques.

ABSTRACT

Bleaching of algal cultures by exposures to high light intensities is used to evaluate scattering by algal particles and to correct absorption spectra.

KEY WORDS : Algae - absorption spectra - technics.

Les spectres d'absorption réalisés sur les cellules intactes permettent l'étude de la composition pigmentaire de nombreuses algues microscopiques en ne demandant qu'un minimum de manipulations (Shibata, 1958).

Cette méthode n'est toutefois pas applicable aux organismes filamenteux pourvus d'une gaine mucilagineuse tels que certaines Cyanophycées qui s'agglomèrent parfois très rapidement et décantent, ce qui provoque des variations importantes de la densité optique (D.O.) à longueur d'onde constante.

Ainsi, en quatre minutes (temps minimum pour réaliser un spectre d'absorption dans le visible avec un spectrophotomètre « Beckman model 25 ») les variations relatives de D.O. 745, D.O. 685, D.O. 550 et D.O. 440 sont supérieures à 35 % pour les mesures effectuées à travers les faces claires des cuves et supérieures à 25 % pour des mesures effectuées à travers les faces dépolies; cette dernière méthode ayant pour effet de diminuer de façon notable l'erreur due à la diffusion (Glazer, 1971). Dans les deux cas la réalisation d'un spectre convenable est impossible (fig. 1).

Par contre les cellules cassées à la presse de French (20 000 p) donnent des suspensions homogènes et stables pendant un temps largement suffisant pour établir le spectre (fig. 1).

La comparaison des spectres obtenus pour une même culture à partir de cellules entières et de cellules cassées à travers les faces claires et les faces dépolies (fig. 2) montre que le passage diminue de façon considérable le « bruit de fond » dû à la diffusion de la lumière et rend pratiquement inutile l'utilisation des faces dépolies (qui présente l'inconvénient d'introduire une déviation variable avec la longueur d'onde si les cuves ne sont pas parfaitement appariées).

Une fois le spectre des cellules cassées établi il convient de le corriger de la diffraction due aux particules en suspension dans le milieu.

Une correction simplifiée consiste à soustraire l'absorbance mesurée à 730 nm (Jones et Myers, 1965). Toutefois les travaux de Sigalat et de Kouchkovsky (1975) ont montré que l'absorbance de particules d'algues cassées varie avec la longueur d'onde suivant une équation simplifiée $D \approx 44\,000 D \cdot \lambda^{-1.6}$. Ces chercheurs préconisent l'utilisation d'abaques de correction établies à partir de particules algales dépigmentées par extraction des pigments. Les résultats obtenus sont excellents, toutefois l'établissement des abaques est un travail long et fastidieux.

Un résultat similaire peut être obtenu en exposant la culture à de très fortes intensités lumineuses pendant quelques heures. Il se produit alors une décoloration totale des cellules (bleaching) qui sont ensuite cassées. La suspension ainsi obtenue sert à établir le spectre de diffusion qui permet de corriger le spectre d'absorption (fig. 2).

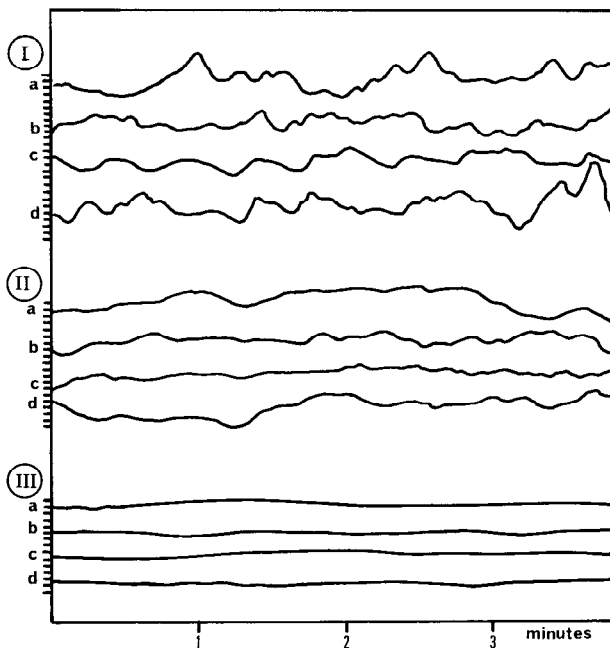


Fig. 1. — Variation pendant quatre minutes de D.O. 685 (a) D.O. 550 (b) D.O. 745 (c) D.O. 440 (d) mesurée sur une culture d'*Anabaena* sp.

I : culture intacte; mesure à travers les faces claires de la cuve.

II : culture intacte; mesure à travers les faces dépolies de la cuve.

III : culture cassée; mesure à travers les faces claires de la cuve.

Une division sur l'axe des ordonnées correspond à 0,02 D.O.

La possibilité de décoloration totale d'une culture dans un intervalle de temps donné dépend de l'intensité lumineuse incidente (I_i), de la densité optique de la culture (D) et de l'épaisseur de la culture (l). Nous avons été amenés à définir une intensité lumineuse efficace (I_e) dont l'équation théorique fait intervenir ces différents paramètres et telle que :

$$I_e \cdot \int_0^l dx = \int_0^l I_x dx \quad (1)$$

I_x est l'intensité lumineuse à une distance x de la surface de la culture et l'on admet que l'éclairement est unidirectionnel et perpendiculaire à la surface de la culture.

De la définition (1) on tire :

$$I_e = I_i \cdot \frac{1 - e^{-k \cdot D \cdot l}}{k \cdot D \cdot l} \quad (2)$$

où k est une constante caractéristique de l'algue.

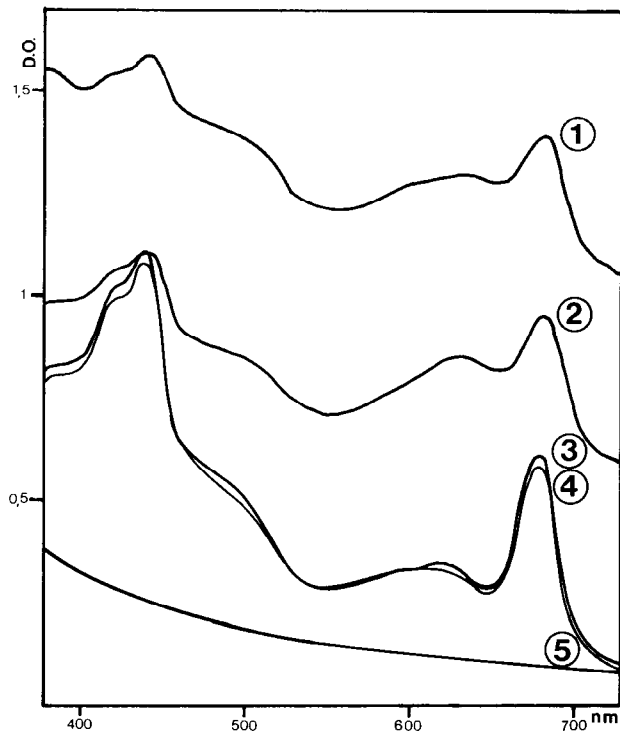


Fig. 2. — Spectre d'absorption d'une culture d'*Anabaena* sp.

(1) culture intacte; mesure à travers les faces claires de la cuve.

(2) culture intacte; mesure à travers les faces dépolies de la cuve.

(3) culture cassée; mesure à travers les faces claires de la cuve.

(4) culture cassée; mesure à travers les faces dépolies de la cuve.

(5) culture décolorée et cassée; mesure à travers les faces claires de la cuve.

En faisant intervenir l'intensité lumineuse mesurée à la sortie de la culture (I_s) l'équation (2) devient :

$$I_e = \frac{I_i - I_s}{2,3 (\log I_i - \log I_s)}$$

A titre indicatif une intensité efficace de l'ordre de 25 000 lux est suffisante pour décolorer totalement en trois ou quatre heures la culture d'*Anabaena* utilisée.

A partir d'une même culture d'*Anabaena* sp. nous avons établi, d'une part, un spectre différentiel entre cellules cassées et cellules décolorées puis cassées et, d'autre part, le spectre des pigments liposolubles extraits dans l'acétone (fig. 3). En tenant compte du décalage des spectres dû à l'extraction (Emerson et

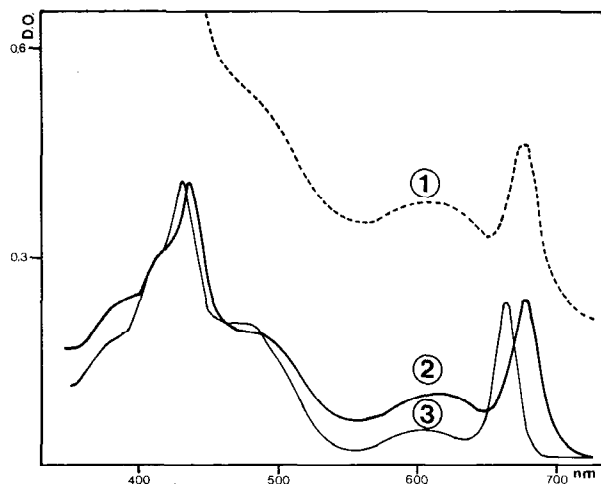


Fig. 3. — Comparaison de spectres d'absorption obtenus à partir de la même culture d'*Anabaena* sp; mesure à travers les faces claires de la cuve; cellules cassées. 1 : spectre non corrigé. 2 : spectre différentiel entre cellules cassées et cellules décolorées puis cassées. 3 : spectre des pigments extraits à l'acétone.

Lewis, 1943), on constate une concordance satisfaisante dans les zones correspondant aux pigments liposolubles.

Cette méthode est utilisable directement avec des cultures axéniques. Elles peuvent éventuellement être utilisées pour des cultures unialgales à condition de bloquer le développement microbien lors de l'exposition à la lumière au moyen d'un produit bactériostatique n'influant pas sur le spectre (Chloramphenicol par exemple).

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

BIBLIOGRAPHIE

- EMERSON (R.), LEWIS (C. M.), 1943. — The dependence of the quantum yield of chlorella photosynthesis on wavelength of light. *Am. J. Bot.*, 30 : 165-178.
- GLAZER (A. N.), COHEN-BAZIRE (G.), STANIER (R. Y.), 1971. — Characterization of Phycoerythrin from *Cryptomonas* sp. *Arch. Mikrobiol.*, 80 : 1-18.
- JONES (L. W.), MYERS (J.), 1965. — Pigment variations in *Anacystis nidulans* induced by light of selected wavelengths. *J. Phycol.*, 1 : 7-14.
- SHIBATA (K.), 1958. — Spectrophotometry of intact biological material. *J. Biochem.*, 45 : 599-623.
- SIGALAT (C.), KOUCHKOVSKY (Y. de), 1975. — Fractionnement et caractérisation de l'appareil photosynthétique de l'algue bleue unicellulaire *Anacystis nidulans* : I, obtention de fraction membranaires par « lyse osmotique » et analyse pigmentaire. *Physiol. Veg.*, 13 (2) : 243-258.

ANNEXE

Les absorptions pigmentaires individuelles sont calculées d'après les équations de Sigalat et Kouchkovsky (1975).

$$A_{435, \text{car}} = 1,1520 A_{435} - (0,0244 A_{678} + 0,0415 A_{685})$$

$$A_{625, \text{pey}} = 1,0114 A_{625} - 0,2488 A_{678}$$

$$A_{678, \text{chl}} = 1,0114 A_{678} - 0,0465 A_{625}$$

Pour obtenir les concentrations en pigment, les valeurs de A données par ces équations sont divisées par les coefficients d'extraction moléculaire *in vivo* ε :

$$\varepsilon_{435, \text{car}} = 94\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{625, \text{pey}} = 210\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{678, \text{chl}} = 103\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$