

Conseil international pour
l'Exploration de la Mer

C.M.1978/L : 20
Comité de l'Océanographie biologique

AMELIORATION DE LA CONSERVATION DES PIGMENTS DU ZOOPLANCTON

par

M. MASTAIL et A. BATTAGLIA*

Résumé.

Le formol utilisé pour conserver les échantillons de zooplancton provoque la décoloration des individus par oxydation des pigments.

Une solution de fixation a été mise au point afin de permettre l'amélioration de la conservation des chromatophores des planctontes.

Les résultats montrent qu'il est possible de retarder fortement la disparition des pigments du zooplancton et ainsi de faciliter la détermination des taxons.

Summary.

Formolin used for fixation and preservation of zooplankton samples induce discolouration specimens by pigments oxidation.

A fixating fluid has been worked out to allow the improvement of preservation from plankters chromatophores.

Results shown that it is possible to defer strongly pigments fading from zooplankton and so to make taxon determinations easier.

* M.MASTAIL - ISTPM Station biologique 29211 Roscoff (France)

A.BATTAGLIA -ISTPM B.P. 1049 44037 Nantes Cédex (France)

Une fois récolté, le zooplancton doit être fixé (le plus souvent au formol) en attendant le tri et les comptages. Le triage par taxon des échantillons nécessite un temps important. Cette opération est facilitée sur du matériel vivant par la présence des chromatophores souvent très caractéristiques d'une espèce bien définie. L'oxydation photochimique très rapide de ces chromatophores était la cause à notre avis d'une limitation de la vitesse de tri des planctontes. La méthode proposée a pour but l'amélioration d'une façon notable de la conservation des pigments en vue d'un examen ultérieur.

NATURE DES REACTIONS DE DECOLORATION.

Le formol s'additionne très facilement sur les doubles liaisons des composés insaturés dont font partie les pigments des chromatophores. Il s'agit très souvent de pigments du type carotène à système conjugué relativement long. Les caroténoïdes sont très sensibles à l'oxydation par l'oxygène de l'air, réaction catalysée par la lumière, par les lipoxydases et les peroxydes lipidiques formés aux dépens des acides gras insaturés.

Ces réactions peuvent se décomposer en trois groupes.

a) Les réactions d'initiation.

Elles sont catalysées, pour l'initiation primaire par la lumière, la chaleur, l'oxygène et certains métaux (Cu, Fe, Ni...) et pour l'initiation secondaire par la présence de radicaux libres. C'est une phase réversible.

b) Les réactions de propagation.

Elles sont catalysées par certains ions métalliques (Cu^{2+} , Fe^{3+} ...) et font réagir les radicaux de la réaction primaire avec les chaînes insaturées pour donner des radicaux libres réutilisés pour la phase initiatrice et des peroxydes à durée de vie très courte. La présence d'ions métalliques non complexés joue un rôle important pour le déroulement de cette phase irréversible.

c) Les réactions d'arrêt.

Elles se produisent soit par rupture des peroxydes donnant lieu à la formation de dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes et cétones), soit par addition photochimique de radicaux libres avec apparition de formes polymères. Cette phase est irréversible.

Etant donné le caractère irréversible des deux derniers groupes de réactions, c'est au niveau de la phase d'initiation qu'il convient d'agir. Il faut ajouter que le formol contient toujours une quantité appréciable de sels ferriques.

MOYENS D'ACTION.

Pour ralentir, voire inhiber les réactions, il faut agir sur les catalyseurs de réactions c'est-à-dire, :

la lumière : on peut conserver les échantillons à l'abri de la lumière,

la chaleur : les réactions d'initiation sont des réactions à énergie d'activation élevée, d'où l'utilisation de chambres réfrigérées ;

- l'oxygène :
- par barbotage d'azote ; cette méthode est peu facile à employer en raison de son manque de souplesse et la désoxygénation n'est jamais totale ;
 - par addition de produits ralentissant les échanges gazeux (propylène glycol) ;
 - par addition d'antioxydant : vitamine C, butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) ;
 - par complexation de métaux libres (EDTA)
 - par utilisation de résines spécifiques de déminéralisation.

Nous avons tout d'abord fait des essais avec utilisation d'acide ascorbique à différentes concentrations (de 0,13 g/l jusqu'à 5 g/l). Il s'avère que l'action de la vitamine C qui agit par détournement de la réaction des peroxydes n'est pas suffisamment durable. La coloration des pigments s'estompe progressivement au bout de quelques dizaines de jours. Cependant elle permet dans la solution d'éviter l'apparition d'une coloration rosée devenant brune.

Dans nos essais nous avons utilisé du butylhydroxyanisol. Son action s'avère fortement tributaire de la teneur en EDTA qui complexe les ions métalliques. L'effet est très faible quand le milieu contient des ions métalliques libres en quantité notable (sels ferriques du formol et sels métalliques de l'eau de mer).

La formule suivante est proposée :

Acide ascorbique	0,2 g
EDTA disodique	2 g
BHA	150 mg
Propylène glycol	50 ml
Formol 4 à 2 % selon le volume des planctontes	
Eau distillée et déminéralisée	qsp 1 l

ou

Eau de mer

Ramener à pH 7,2 - 7,5 en employant du glycérophosphate de sodium. Il est important de dissoudre le BHA dans le propylène glycol avant de l'ajouter dans la solution.

Le borate n'a pas été employé car il favoriserait une plus rapide décoloration des spécimens (BALACHANDRAN, 1976). Afin d'éviter d'obtenir une trop grande pression osmotique, il est préférable d'employer de l'eau distillée. On devra s'attacher, parallèlement à l'utilisation d'EDTA, à ce que cette eau ne contienne que peu de sels métalliques (utilisation de distillateur sans serpentin en cuivre) et on évitera les contacts avec des parties métalliques.

Le propylène glycol, hormis ses propriétés anti-oxydantes, abaisse le point de congélation permettant ainsi de stocker sans crainte à + 2°C. D'autre part, il améliore la pénétration du formol en tant que fixatif et diminue la rigidité des arthropodes, rendant plus facile leur manipulation.

Afin d'éviter une trop grande oxydation de la solution, il convient de limiter l'agitation au maximum, ce qui n'est d'ailleurs pas toujours aisé sur un bateau. Nous avons observé au début l'apparition d'une couleur rosée des échantillons lorsqu'ils sont soumis à une agitation vigoureuse. L'utilisation d'acide ascorbique semble empêcher ce phénomène.

RESULTATS OBTENUS.

Nous avons pu obtenir de bons résultats pour les pigments rouges des crustacés et des larves de poissons. Dans le cas des zoés de brachyours , des copépodes et des larves de poissons, comme Solea vulgaris et Platichthys flesus par exemple, nous avons remarqué aussi une bonne conservation des pigments jaunes.

La séparation d'espèces proches mais parfois très diversement colorées s'en trouve grandement facilitée, comme dans le cas des larves de crustacés ou des pleuronectiformes pour les larves de poissons.

Pour la majorité des espèces, nous avons remarqué une conservation encore convenable des couleurs après quatre à cinq mois pour des échantillons stockés à l'obscurité en chambre réfrigérée.

Cependant il faut signaler que les pigments de planctons varient d'une façon naturelle en intensité, en particulier selon les saisons. En hiver le plancton est faiblement coloré ; il l'est fortement au printemps. On peut supposer une relation avec le phytoplancton (teneur en précurseur des caraténoïdes par exemple).

Il faut signaler l'importance de la qualité de la lumière du microscope avec lequel on observe. Avec le système à lampe conventionnelle on n'observe que très difficilement les chromatophores jaunes. En fait, la meilleure lumière pour une observation correcte des couleurs est la lumière naturelle ou une lumière très proche.

La méthode proposée n'inhibe pas complètement la décoloration mais la retarde d'une façon appréciable et permet ainsi de faciliter bon nombre de déterminations ce qui accélère la vitesse de tri, facteur important des études planctoniques.

AUTEURS CONSULTES

- AHLSTROM (E.H.), 1976. - Maintenance of quality in fish eggs and larvae collected during plankton hauls. - In : - Zooplankton fixation and preservation, The Unesco Press : 313-318.
- BALACHANDRAN (T.), 1976. - Fixation and preservation experiments on marine zooplankton at Cochin ; outline of experiments and results. - In : - Zooplankton fixation and preservation, The Unesco Press : 333-339.
- BOON (D.), 1977. - Coloration in bivalves A review. - J. Food Science, 42 (4) : 1008-1012.
- CHEFTEL (J.C.) et CHEFTEL (H.), 1976. - Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. - Paris, Entreprise moderne d'Édition.
- GOVINDARAJAN (S.), HULTIN (H.O.) et KOTULA (A.W.), 1977. - Myoglobin oxidation in ground beef : Mechanism studies. - J. Food Science, 42 (3) :
- STEEDMAN (H.F.), 1976. - General and applied data on formaldehyde fixation and preservation of marine zooplankton. - In : - zooplankton fixation and preservation, The Unesco Press : 103-154.
- TOYAMA (K.) et MIYOSHI (G.), 1963. - Prevention for color fading on aquatic animals under preservation - I-Test on preservatives to retain red color in fish and crustacean specimens. - J. Tokyo Univ. Fish, 50 (1) : 43-48.
- TOYAMA (K.), SUGIYAMA (I.) et MAYASHI (I.), 1965. - Reaction mechanism for antioxidant applied to marine products. III - Solubility of commercial antioxidant in oil and organic solvents. - J. Tokyo Univ. Fish., 51 (1) : 73-80.