

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

RAPPORT

PRÉSENTÉ PAR

WILLIAM SENIOR GALINDO

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
D'ÉTUDES APPROFONDIES :

" CHIMIE APPLIQUEE : OPTION CHIMIE MARINE "

x
x x
x

JUIN 1984

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
LABORATOIRE D'Océanographie Chimique

ANALYSE DES SUCRES PAR CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE, H.P.L.C.
APPLICATION A L'EAU DE MER.

PAR

IV-1 PRINCIPES DE LA MÉTHODE
WILLIAM SENIOR

INTRODUCTION

OBJECTIFS DE L'ETUDE

I - CLASSIFICATION ET STRUCTURE DES GLUCIDES

I-1 CLASSIFICATION

I-2 STRUCTURE

II - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX

II-1 RÉACTIONS BASÉES SUR LE CARACTÈRE RÉDUCTEUR
DES OSES

II-2 RÉACTIONS DE FORMATION DES DÉRIVÉS DU FUR-
FURAL PAR L'ACIDE SULFURIQUE

II-3 AUTRES MÉTHODES

II-4 DISCUSSION

III - DOSAGE SPECIFIQUE DES GLUCIDES

III-1 SÉPARATION ET DÉTECTION DES OSES EN HPLC

III-2 DÉRIVATIONS POST-COLONNES

III-3 DÉRIVATIONS PRÉ-COLONNES

IV - PARTIE EXPERIMENTALE

IV-1 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

IV-2 RÉACTION

IV-3 MODE OPÉRATOIRE

IV-4 APPAREILLAGE

V - LES GLUCIDES DANS LE MILIEU MARIN

V-1 CARBOHYDRATES PARTICULAIRES TOTAUX (CHOPT)

V-2 SPECTRE DES MONOSACCHARIDES

V-3 LES OSES DANS LA MOP

V-4 LES OSES DANS L'EAU DE MER

VI - CONCLUSIONS

Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres. Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres. Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres.

Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres. Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres.

Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres. Les analyses effectuées sur les échantillons de la mer Méditerranée ont permis de constater que les glucides sont présents dans le milieu marin sous forme de particules dissoutes et de sucres libres.

INTRODUCTION

L'eau de mer contient en différentes proportions les composés organiques les plus divers. Une approche possible de ce vaste domaine d'étude consiste en la mise au point de méthodes de dosage de ces constituants, soit sous la forme de dosages globaux, soit sous la forme de dosages spécifiques.

Le dosage spécifique de la matière organique (MO) dans l'eau de mer pose des problèmes analytiques importants en grande partie du fait des faibles concentrations de celle-ci et de la présence de grandes quantités de sels. En outre, les dosages spécifiques sont souvent longs et délicats à mettre en oeuvre et ils ne peuvent s'adresser qu'à un nombre limité d'échantillons.

En travaillant à la mise au point du dosage spécifique des carbohydrates (CHO) dans l'eau de mer par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), nous avons essayé d'apporter une contribution à la résolution de ces problèmes.

Les glucides sont des constituants importants de la matière organique particulaire (MOP) et notamment du phytoplancton où ils représentent en moyenne de 15 à 40 % du poids sec (1). Ils représentent avec les acides aminés la fraction labile de la matière organique dissoute (MOD) et sont directement associés aux processus géochimiques qui ont lieu dans l'environnement marin (2). Ces composés sont rapidement recyclés et constituent donc une source considérable de nourriture pour les bactéries hétérotrophes (3).

Le dosage des carbohydrates dissous totaux (CHODT) et des carbohydrates particulaires totaux (CHOPT) dans l'eau de mer a été entrepris par un grand nombre de chercheurs (4-6). Ceci est peut être dû au fait que ces composés représentent une fraction importante de la matière organique du milieu marin et, qu'ils jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes liés à la vie.

LES OBJECTIFS

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

Les objectifs de la présente étude sont multiples et sont à situer dans un cadre plus général. Il s'agit :

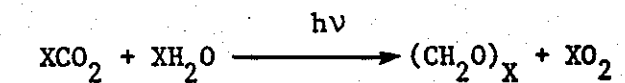
1. de sélectionner parmi les méthodes d'analyses chromatographiques (HPLC) existantes, celles susceptibles d'être adaptées à notre appareillage puis de mettre au point la méthode retenue pour le dosage spécifique des sucres aussi bien dans la MOP que dans la MOD.
2. d'utiliser cette méthode d'analyse à l'étude des carbohydrates dans la Rade de Brest.

I - CLASSIFICATION ET STRUCTURE DES GLUCIDES

I-1 CLASSIFICATION

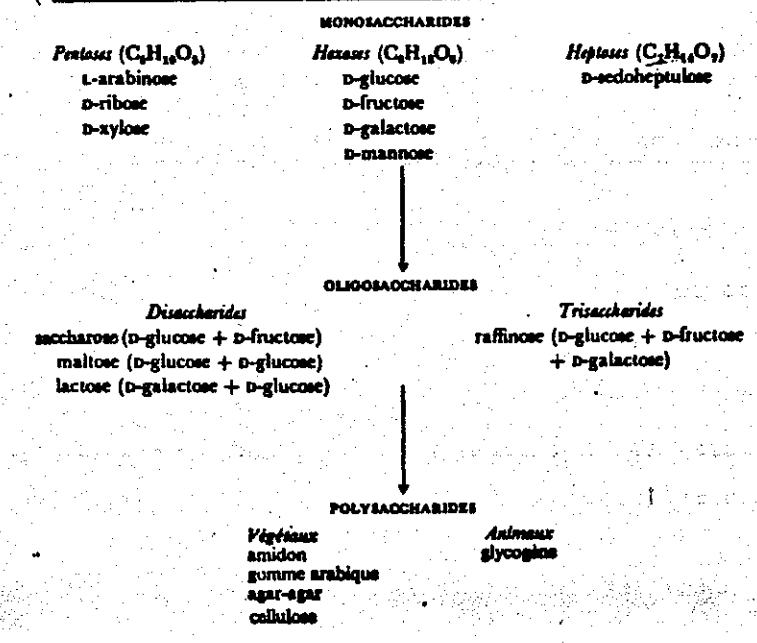
Les hydrates de carbone (saccharides) sont des polyhydroxyaldéhydes (aldoses) et des polyhydroxycétones (cétoses) aliphatiques. Plus généralement, on appelle glucides toutes les substances qui dérivent biogénétiquement de ces composés (polyols, aminosides, acides uroniques, oligosaccharides, polysaccharides, etc...).

Les hydrates de carbone ou glucides sont formés dans les plantes vertes par photosynthèse



Leur classification est basée sur la nature constitutive et le degré de polymérisation des molécules.

La figure I donne une classification simple des glucides.



I-2 STRUCTURE

Les oses existent essentiellement sous forme cyclique de type "furanose" ou "pyranose" (fig. 2). La cyclisation de la molécule donne naissance à un nouveau centre d'assymétrie : le carbone C_1 donnant deux anomères α et β . Dans l'anomère β , l'hydroxyle du carbone C_3 est au-dessus du plan de la molécule et inversement pour l'anomère α . En milieu aqueux, ces deux formes sont en équilibre réciproque par l'intermédiaire de la forme ouverte (fig. 3) ; à l'équilibre 65 %, du glucose, se trouve sous forme β (la plus stable) et 35 % sous forme α .

La figure 4 montre la structure de certains oses.

II - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX

La plupart de ces déterminations sont réalisées par colorimétrie. Ces méthodes utilisent soit le pouvoir réducteur des oses, soit leur propriété de donner des dérivés du furfural sous l'action de l'acide sulfurique concentré.

II-1 RÉACTIONS BASÉES SUR LE CARACTÈRE RÉDUCTEUR DES OSES

Ces réactions utilisent la capacité des oses de réduire les sels cuivriques pour donner une coloration variable suivant la nature du dérivé (7).

D'autres sont basées sur la réduction des sels de tétrazolium (8) ou celle de l'hexaferrocyanure de potassium en milieu basique (9).

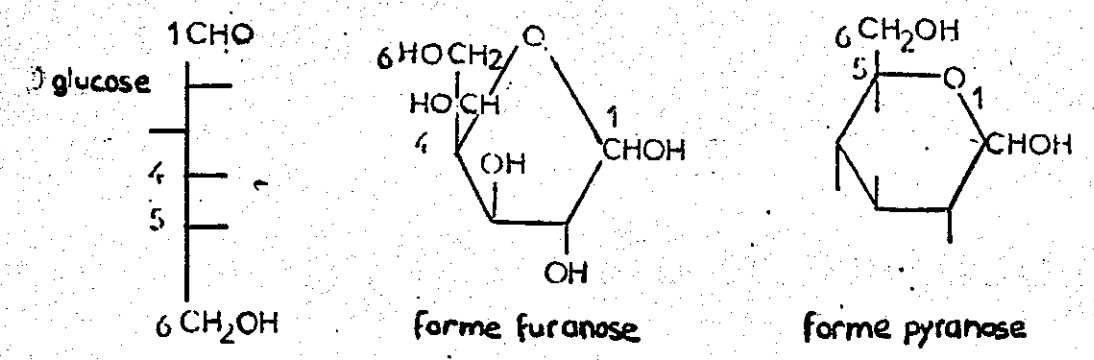


Figure 2 : Formes ouverte et cycliques du glucose.

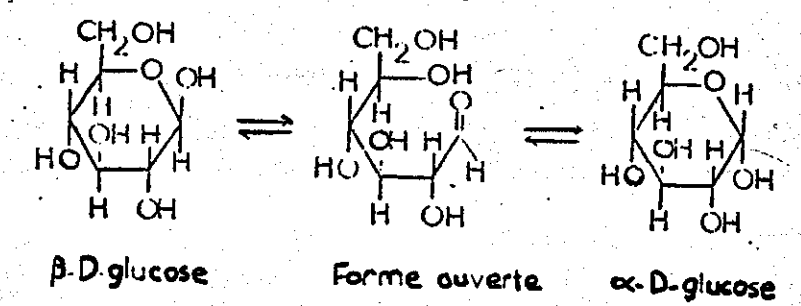


Figure 3 : Equilibre dynamique entre les anomères α et β du glucose.

Nom	Structure en chaîne ouverte	Structure hémiacétal cyclique	Fonction et origine	Structure en chaîne ouverte	Structure hémiacétal cyclique
D-glucose	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$				
D-fructose	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{C=O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$		à l'état libre dans le miel les jus de fruits ; à l'état combiné dans les glucosides et polysaccharides	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	
D-mannose	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$		à l'état combiné dans certains N-glucosides comme les acides nucléiques, certaines vitamines et certains coenzymes	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	
D-xylose	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$		à l'état combiné dans certains N-glucosides comme les acides nucléiques	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	
D-xylose	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$		à l'état de polysaccharides dans les matières ligneuses	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	
Lactose	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$				

* La forme pyranose est souvent plus stable que la forme furanose pour le sucre libre. La structure furanose est montrée pour le ribose et le désoxyribose parce que c'est la forme sous laquelle on trouve ces sucres dans beaucoup de substances importantes comme les acides nucléiques.

Figure 4 : Hexoses et aldopentoses caractéristiques

II-2 RÉACTIONS DE FORMATION DES DÉRIVÉS DU FURFURAL PAR L'ACIDE SULFURIQUE

Ce sont les réactions les plus utilisées pour le dosage des glucides ; car elles sont faciles à mettre en oeuvre et de plus rapides.

Les oses en présence d'acide sulfurique concentré donnent un dérivé du furfural (furfuraldéhyde pour les pentoses, et hydroxyméthyl-furfuraldéhyde pour les hexoses, fig. 5).

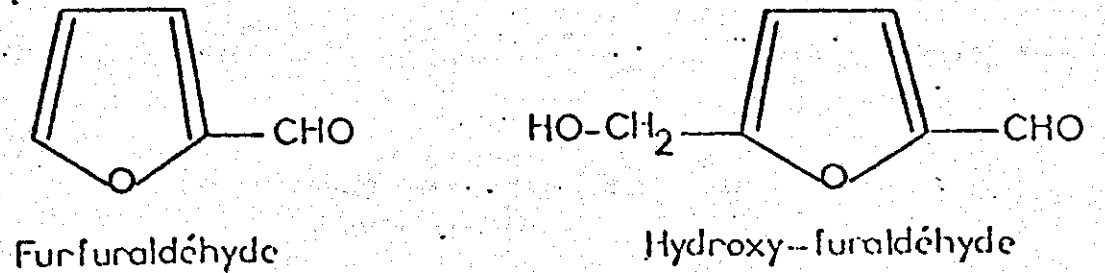


Figure 3 : Dérivés furfuraux des oses.

Ces dérivés réagissent avec divers composés tels que le phénol, le L-tryptophane, l'orcinol, l'antrone, la cystéine, le N-éthylcarbazol, le résorcinol et l'hydroxy-5 tétralone-1, pour donner des dérivés colorés.

II-3 AUTRES MÉTHODES

La détermination quantitative de glucides par préparation de dérivés fluorescents est moins utilisée. Cependant, l'acide p-hydroxybenzoïque (10), l'éthylénédiamine (11), la cyano-2 acétamide (12), les dérivés de la xanthénone (13), ont été utilisés dans ce but.

On pourrait aussi citer les méthodes enzymatiques (14), les dosages ampérométriques (15) et la réaction avec le chlorhydrate de 3-méthyl-2 benzathiazoline ou MBTH (16). Cette dernière utilise la propriété de l'acide périodique de dégrader les composés polyhydroxylés en formol qui est ensuite dosé par le MBTH. Cependant, son application est très longue puisqu'elle nécessite trois étapes, ce qui limite son utilisation comme méthode de routine.

II-4 DISCUSSION

On peut reprocher à la plupart de ces méthodes de donner des résultats dépendant de la nature des oses présents, et par conséquent, d'être très approximatives. Seule la méthode au MBTH s'affranchit de cette critique et de plus permet le dosage des sucres non-réducteurs, les polyols notamment. C'est la méthode la plus sensible et la plus fiable pour la détermination des glucides totaux dans l'eau de mer. Malheureusement, son utilisation est limitée pour les causes exposées précédemment.

En océanographie, la méthode au phénol-sulfurique (17) est la plus utilisée pour le dosage global des glucides de la MOP (18-20) et des sédiments (21-23). Néanmoins, l'application de cette méthode à la détermination des CHOD est limitée, du fait de sa faible sensibilité.

La substitution du phénol par le L-tryptophane, permet d'améliorer la sensibilité de la méthode, mais la reproductibilité de celle-ci est faible. EBERLEIN et HAMMER(24) obtiennent une bonne reproductibilité en réalisant le dosage automatiquement avec un appareil du type Technicon.

III - DOSAGE SPECIFIQUE DES GLUCIDES

La séparation et le dosage des glucides fait appel aux méthodes chromatographiques ; qu'elles soient sur papier (25) ; sur plaque (26) ; liquide (27, 28), gazeuse (29) ou HPLC (30- 34).

Dans le milieu marin plusieurs auteurs ont réalisé la séparation des oses par chromatographie sur papier (18, 35), par chromatographie gazeuse (36, 37), par chromatographie d'échange d'ions (3, 21, 39, 38).

Depuis quelques années, la chromatographie en phase liquide bénéficie d'un regain d'intérêt grâce à des séparations rapides obtenues à présent en moins d'une heure. Ce développement est dû essentiellement à une plus grande efficacité des colonnes et à l'utilisation d'une vitesse de phase mobile élevée.

Comparée aux autres méthodes d'analyse des oses, la HPLC est plus rapide, plus sensible et plus apte à l'analyse de routine que la chromatographie sur papier ou sur colonne à pression atmosphérique. Seule, la chromatographie gazeuse des oses demeure encore 50 à 100 fois plus sensible que la HPLC et présente quelques avantages quant à la séparation de certaines oses.

De nombreux résultats ont été publiés sur la HPLC des oses. Cependant , elle pose deux problèmes : la séparation et la détection.

III-1 SÉPARATION ET DÉTECTION DES OSES EN HPLC

La séparation des oses par HPLC a été réalisée sur différents supports :

- résines échangeuses d'ions (40)
- silice greffée à phase normale (41)
- silice microparticulaire, avec ou sans "amine modifié" (41, 34).

Les séparations sont généralement bonnes et peuvent être améliorées par l'utilisation de gradients d'élution. Par contre, la détection réalisée, soit par U.V, soit par l'indice de réfraction, n'est pas suffisamment sensible pour l'analyse des oses dans le milieu marin.

C'est pour palier cet inconvénient qu'ont été développées des techniques comportant une transformation des glucides avant leur injection ou en sortie de colonne.

III-2 DÉRIVATIONS POST-COLONNES

Beaucoup de réactifs ont été utilisés pour le dosage post-colonnes des glucides. Nous ne citerons que les principaux : bleu de tétrazolium(8) complexe du cuivre 2,2'-bicinchoninate (42), complexe de cuprammonium (43). Les autres méthodes mettent en oeuvre des réactifs corrosifs.

Cependant, les réactions post-colonne s'accompagnent souvent d'une diminution de la résolution des pics chromatographiques et ne peuvent donc pas être utilisées pour doser les oses qui sont mal séparés en sortie de colonne (32).

III-3 DÉRIVATIONS PRÉ-COLONNES

A l'inverse du cas précédent, les techniques qui font appel à une dérivation pré-colonne des oses par des chromophores aromatiques n'abaissent pas la qualité de leur résolution, tout en multipliant par trois ou quatre ordres de grandeur la sensibilité de leur détection. Bien plus, la fixation des chromophores accroît, en modifiant les fonctions et la structure spatiale des oses les possibilités de séparation chromatographiques d'oses très voisins dans l'état non dérivé.

THOMPSON (31) et KLOAREG (32) ont ainsi séparé les dérivés perbenzoylés des oses. ALPENFELS et al. (33) et MOPPER et JOHNSON (34), séparent les oses sous forme de dansyl hydrazones, etc...

IV - PARTIE EXPERIMENTALE

Après avoir testé plusieurs méthodes (9, 31, 32), nous avons retenu la méthode décrite initialement par ALPENFELS et al. (33) ; méthode qui a été modifiée par MOPPER et JOHNSON (34). Ces auteurs appliquent cette méthode pour la détermination des glucides dans les milieux biologiques et alimentaires.

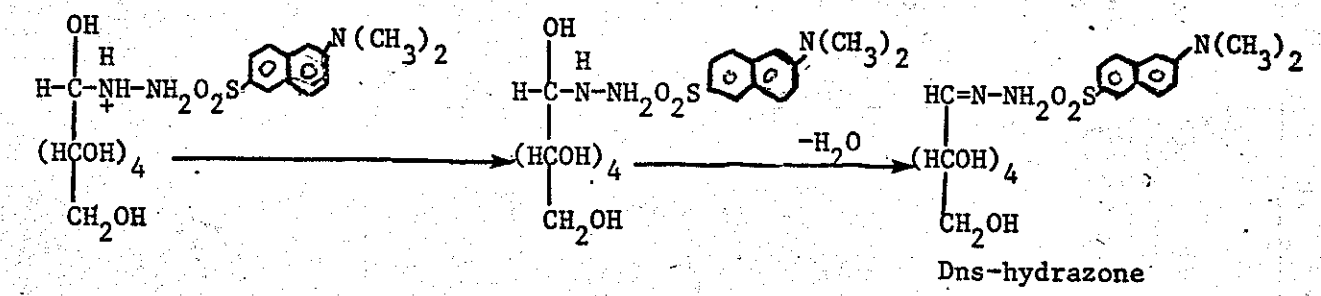
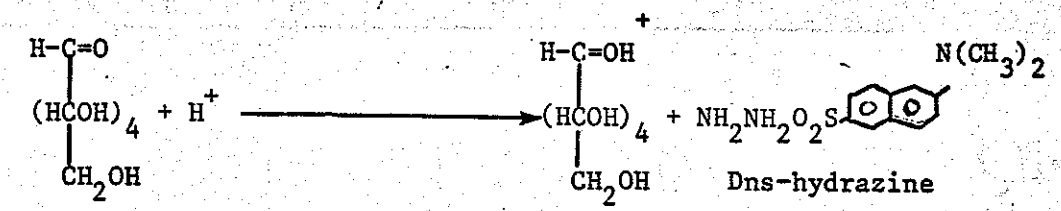
Nous présentons ici une adaptation de la méthode à l'étude des oses dans le milieu marin :

IV-1 PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode se base sur la réaction pré-colonne des oses en milieu acide avec le diméthylamino-5, sulfonylhydrazine-1 naphthalène (Dns-hydrazine) et la détection des hydrazones des sucres par spectrophotométrie U.V.

IV-2 RÉACTION

La Dns-hydrazine se condense en milieu acide avec les sucres réducteurs pour donner lieu à la formation des Dns-hydrazones des sucres :



IV-3 MODE OPÉRATOIRE

Après prélèvement (fig. 6) les échantillons sont filtrés sur un filtre Whatman GF/C et congelés à -20°C. Le volume filtré variant entre 0.5 et 2 litres selon les stations.

Les filtres sont hydrolysés par l'acide trifluoroacétique (HTFA) 2N pendant 3 heures 1/2 à 100°C.

Les hydrolysats sont filtrés à nouveau et récupérés dans un ballon de 250 ml, puis évaporés dans un évaporateur rotatif à 45°C en présence de 100 µl de glycérol.

Dans le cas de l'eau de mer, 250 ml ont été dessalés par une résine mixte et évaporés sous pression réduite à 45°C. Le résidu est hydrolysé pendant 2 heures 1/2 avec l'HTFA 2N et rééaporé en présence de 100 µl de glycérol.

Dans les deux cas, les résidus sont repris par 3 ml d'eau bidistillée.

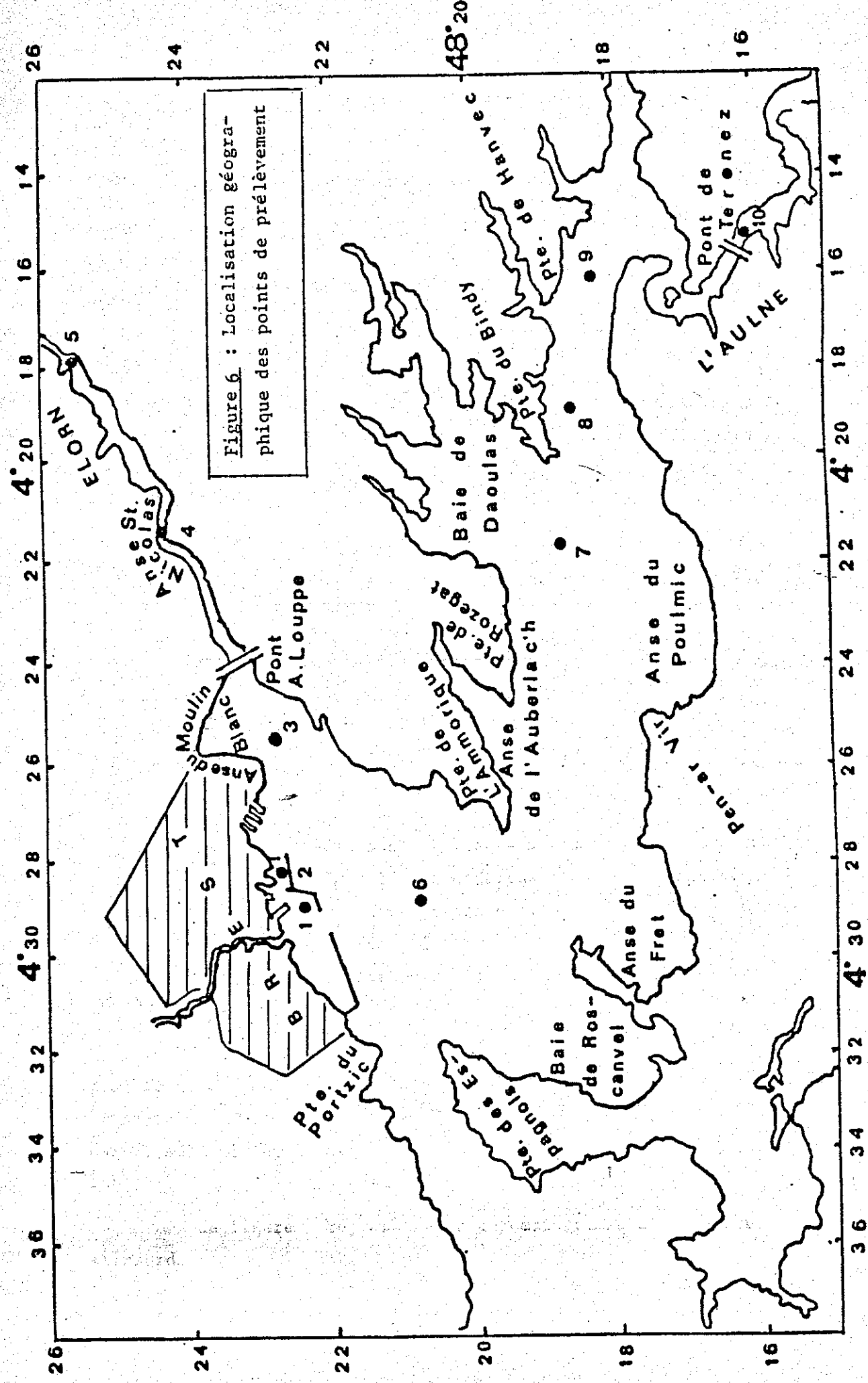


Figure 6 : Localisation géographique des points de prélèvement

A 300 µl de l'échantillon, on y ajoute 15 µl d'acide trichloroacétique (10 %) et 50 µl d'une solution à 5 % de Dns-hydrazine dans l'acétonitrile. Solution qui doit être stockée au réfrigérateur et qui est stable plusieurs semaines.

La réaction s'effectue dans un tube à vis à 65°C pendant 20 Minutes et elle est arrêtée par immersion dans un bain de glace. Le dérivé doit être injecté dans les 2 heures qui suivent. Dans le cas où l'injection ne peut pas se réaliser immédiatement après dérivation, les échantillons doivent être congelés. Dans ces conditions, ils se conservent 2 jours.

IV-4 APPAREILLAGE

Deux systèmes de HPLC ont été employés : un appareil Waters Associates, muni d'une pompe modèle 6000 A, d'un injecteur manuel modèle U6K, et d'un détecteur U.V. à longueur d'onde variable, modèle M450. Un appareil spectra-physics, modèle SP8750, muni d'un distributeur de solvant, modèle SP8 700 et d'un intégrateur SP4100.

Les séparations sont réalisées sur une colonne Lichrospher^R 100 CH-18 (5 µm). Celles-ci sont effectuées en mode isocratique à température ambiante avec une vitesse d'élution de 1 ml/min. L'éluant utilisé est un mélange d'une solution aqueuse d'acide formique 0.02 M et d'acétonitrile dans le rapport 88:12. La détection est faite à 230 nm.

Dans ces conditions, les Dns-sucres sont élués entre deux pics de réactifs (fig. 7). Le premier pic correspondant à des produits de dégradation hydrophile de l'excès de réactif, notamment, l'acide dansyl sulfonique, le deuxième pic correspondant à l'excès de réactif (34).

La figure 7 représente un chromatogramme d'une solution standard.

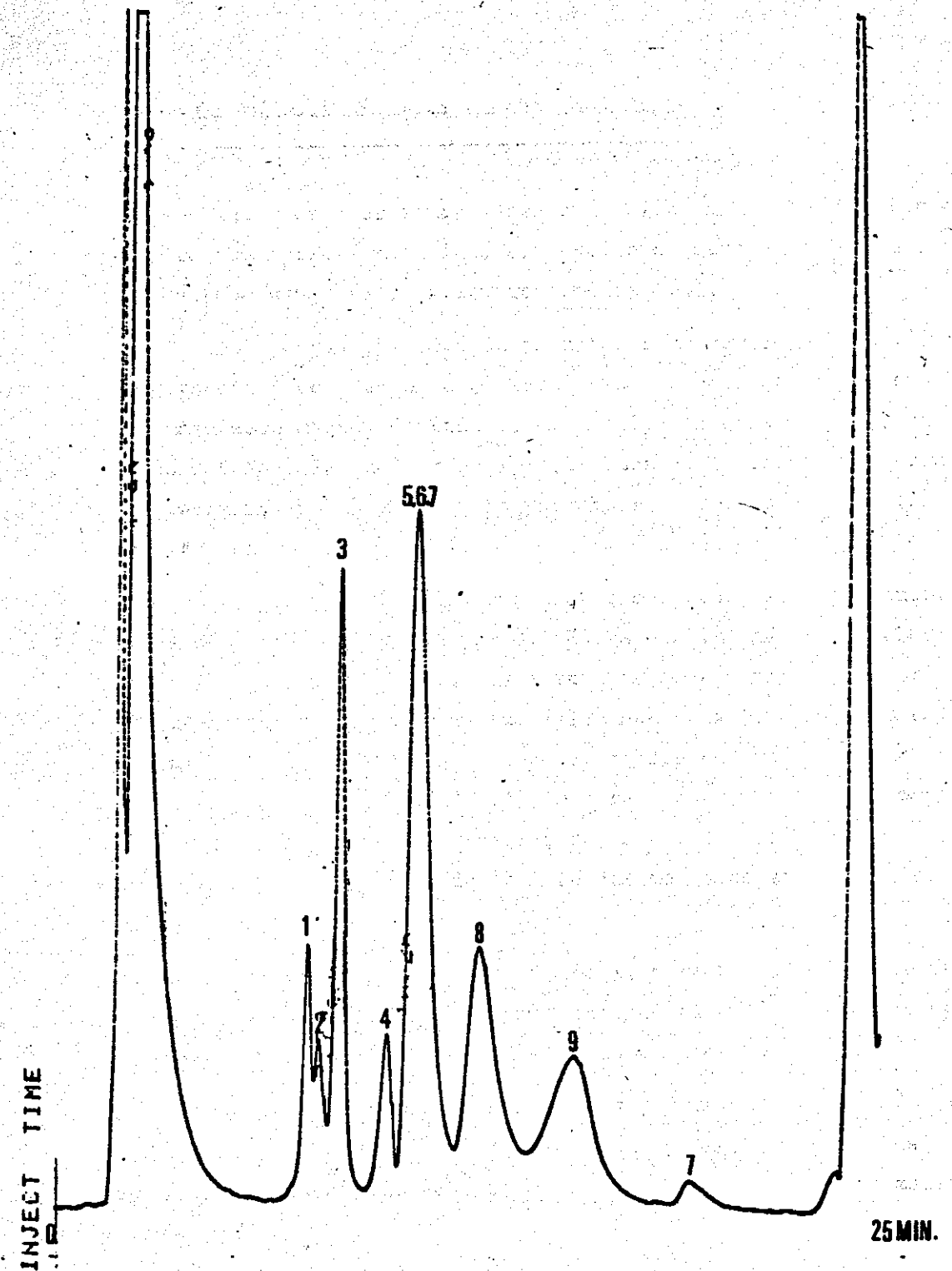


Figure 7 Chromatogramme d'un mélange de glucides. Séparation sur Lichrospher^R RP-18/2 (5 µm). Phase mobile, acide formique (0.02 M), acétonitrile (88-12); débit 1 ml/min; détecteur, spectrophotomètre U.V., 230 nm; pression: 2500 psi. 1 = Dns maltose (7.57)*; 2 = Dns-galactose (7.92); 3 = Dns glucose (8,50); 4 = Dns mannose (10.03); 5 = Dns arabinose (10.74); 6 = Dns xylose (10.74); 7 = Dns fructose (10.74 et 19.41)**; 8 = Dns ribose (13.06); 9 = Dns rhamnose (15.93).

* Les valeurs entre parenthèses indiquent les temps de rétention

** Deux pics représentant respectivement 90 % et 10 % de la quantité injectée.

V - LES GLUCIDES DANS LE MILIEU MARIN

Tous les oses sont présents aussi bien dans la matière organique terrestre que marine, mais la distribution de certains d'entre eux n'est pas identique dans ces deux environnements (21).

Les polysaccharides du plancton sont peu connus, à l'inverse des polysaccharides des algues benthiques qui présentent une grande importance économique. Cependant, deux polysaccharides très abondants dans la MOP sont la laminarine (-1,3-glucan), glucide de réserve du phytoplancton, et la chitine, polysaccharide de structure de l'exosquelette des copépodes (21).

La présence de dix monosaccharides dans des différentes régions de l'océan a été rapportée. HANDA et TOMINAGA (18), DEGENS et al., (35), MOPPER et al., (3) distinguent des composés majoritaires : glucose, fructose, mannose, galactose et xylose, et des composants minoritaires : rhamnose, fucose, ribose et arabinose. Les travaux de LAANE (44) et DELMAS (21), montrent que le rhamnose, peut être un des monosaccharides majoritaires du matériel particulaire : ceci indiquerait la variabilité du spectre des monosaccharides, selon les régions et selon les saisons.

Après avoir adapté une méthode, permettant le dosage des glucides par HPLC, nous nous sommes intéressés à l'analyse des carbohydrates particuliers et dissous dans la rade de Brest.

Dans une première partie, nous présentons une analyse des glucides totaux et nous essayons de montrer que l'étude de ces composés peut être utilisée pour la détermination de l'origine de la matière organique.

La deuxième partie sera consacrée au dosage spécifique des monosaccharides et à l'étude de leur spectre dans les deux estuaires étudiés.

V-1 CARBOHYDRATES PARTICULAIRES TOTAUX (CHOPT)

Avant d'étudier la composition des glucides présents dans la MOP, nous avons estimé par des mesures globales, les fractions solubles et insolubles du matériel glucidique (fig. 8).

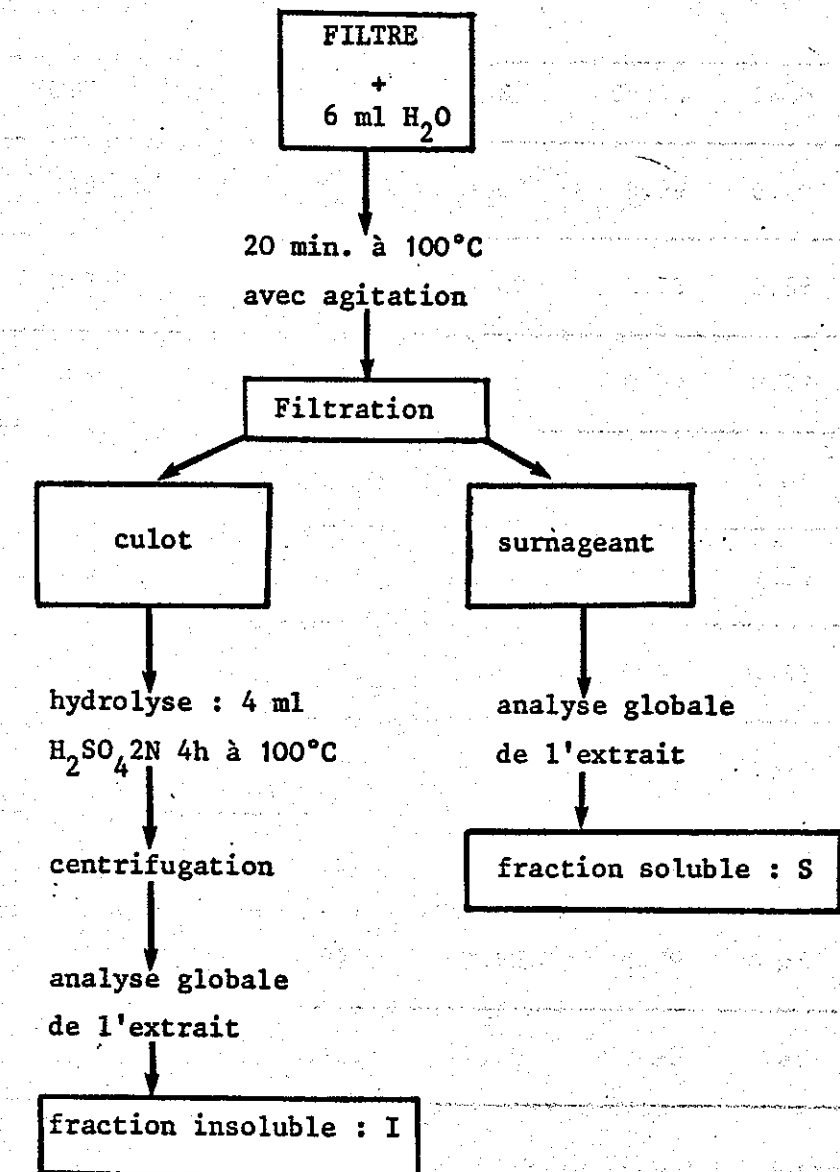


Figure 8 Protocole d'extraction et d'hydrolyse des glucides des fractions solubles et insolubles d'un échantillon du matériel particulaire.

Il a été montré, pour la MOP des eaux que ces deux fractions ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis des dégradations biologiques (45). Dans la MOP, des estuaires étudiés, les glucides solubles représentent de 30 à 56 % des glucides totaux (Tableaux I et II).

St	CHOT	S	I	I/S	Chl.a	Pheo	PH	S°/‰
1	142	70	72	1.03	0.89	0.59	-	34.14
2	257.2	127.3	129.9	1.02	0.75	0.86	-	33.92
3	175	85	90	1.06	0.97	0.77	-	34.09
4	154.7	55.6	99.1	1.78	0.88	1.06	-	31.63
5	376	112	264	2.36	1.17	2.24	-	31.81
6	164.4	53.3	111.1	2.08	0.94	0.65	-	34.44
7	107.5	47.5	60	1.26	0.92	1.50	-	33.43
8	153.3	83.3	70	0.84	0.68	0.68	-	33.00
9	133	46	87	1.89	0.79	0.68	-	31.10
10	600	187.5	412.5	2.20	0.83	1.89	-	19.62

Aulne

Tableau I Distribution des glucides dosés au phénol sulfurique dans la MOP(µg/l) de la rade de Brest au 16.03.84 - S : glucides solubles, I : glucides insolubles ; CHOPT : glucides totaux ; Chl.a : chlorophylle-a (µg/l) ; pheo : pheophytine (µg/l) ; S°/‰, salinité.

St.	CHOPT	S	I	I/S	Chl.a	Pheo.	pH	S°/‰
1	96	54	42	0.78	1.80	0.16	8.17	-
2	72	40	32	0.8	1.38	0.29	8.10	-
3	105	30.3	74.7	2.46	1.53	0.35	8.09	-
4	113.1	78.8	34.3	0.43	-	-	8.04	-
5	384	222	162	0.73	1.68	1.16	7.8	-
6	326	166	160	0.96	1.61	1.07	7.36	-
7	612	212	400	1.89	2.67	2.36	7.84	-
8	1533.3	280	1253.3	4.48	4.19	14	7.94	-
9	584.7	131.4	453.3	3.45	4.70	6.22	8.70	-
10	395.9	187.9	208	1.11	3.65	4.02	8.05	-

Tableau II Distribution des glucides dosés au phénol sulfurique dans la MOP (µg/l) dans l'estuaire de l'Elorn au 20.04.84.

avec un rapport glucides insolubles/glucides solubles (I/S) compris entre 0.4 et 2.4 ; valeurs voisines à celles observées par DELMAS (21) dans le Golfe de Marseille.

HANDA et YANAGI (37), rapportent un pourcentage des glucides solubles de 20 à 40 % dans les eaux du Pacifique.

Le rapport I/S est un index utilisable pour cerner l'état de dégradation et de diagenèse précoce de la MOP des eaux et des sédiments marins (21).

V-2. SPECTRE DES MONOSACCHARIDES

Après avoir étudié l'évaluation globale de la fraction glucidique de la MOP de la Rade de Brest, nous allons considérer les oses constitutifs de ce matériel glucidique. Ceci pour mettre en évidence les relations éventuelles liant la distribution des monosaccharides aux caractéristiques de la M.O (origine, diagenèse précoce, etc...).

V-3 LES OSES DANS LA MOP

Les valeurs obtenues lors de l'analyse globale au phénol-sulfurique sont toujours supérieures à celles obtenues en chromatographie : les oses caractérisés ne constituant en moyenne que 52 % du matériel glucidique total (Tableau III)

St.	GAL	GLU	MAN	ARA+XYL +FRUC	NI	RIB	RHA	NI	CHOPT
4	9.2 (5.9)	10.51 (6.8)	8.9 (5.7)	20.3 (13.1)	Nd	5.48 (3.53)	52 (33.5)	Nd	155
7	15 (9)	17.8 (10.6)	26.9 (16.1)	37 (22.1)	Nd	9.34 (5.6)	26.6 (15.9)	Nd	167 <i>6/103</i>
9	1.89 (1.4)	5.2 (3.9)	9 (6.8)	17.21 (12.9)	4.33 (3.2)	5.24 (3.9)	5.55 (4.2)	11.31 (8.5)	133
10	21.5 (3.6)	16.96 (2.8)	13.3 (2.22)	21.8 (3.6)	Nd	7.7 (1.3)	Nd	31 (5.2)	600

Tableau III : Monosaccharides dans le matériel particulaire après hydrolyse, µg/l(%). MAL, maltose ; GAL, galactose ; MAN, mannose ; ARA, arabinose ; XYL, xylose ; FRUC, fructose ; RIB, ribose ; RHA, rhamnose ; NI, non identifié ; Nd non déterminé ; CHOPT, carbohydrates particulaires totaux.

Le reste serait constitué d'acides uroniques de sucres aminés, de polyols et d'autres polysaccharides difficilement dégradables dans les conditions d'hydrolyse.

Globalement, sur l'ensemble des échantillons, les hexoses sont les formes les mieux représentées (25 %), suivie par les pentoses (13 %) ; cette distribution est constante pour tous les échantillons analysés.

Le tableau III montre que la composition des monosaccharides varie dans des proportions importantes à la fois dans le temps et dans l'espace. D'autre part, la composition du produit final de l'hydrolyse est simple et relativement uniforme (fig. 9).

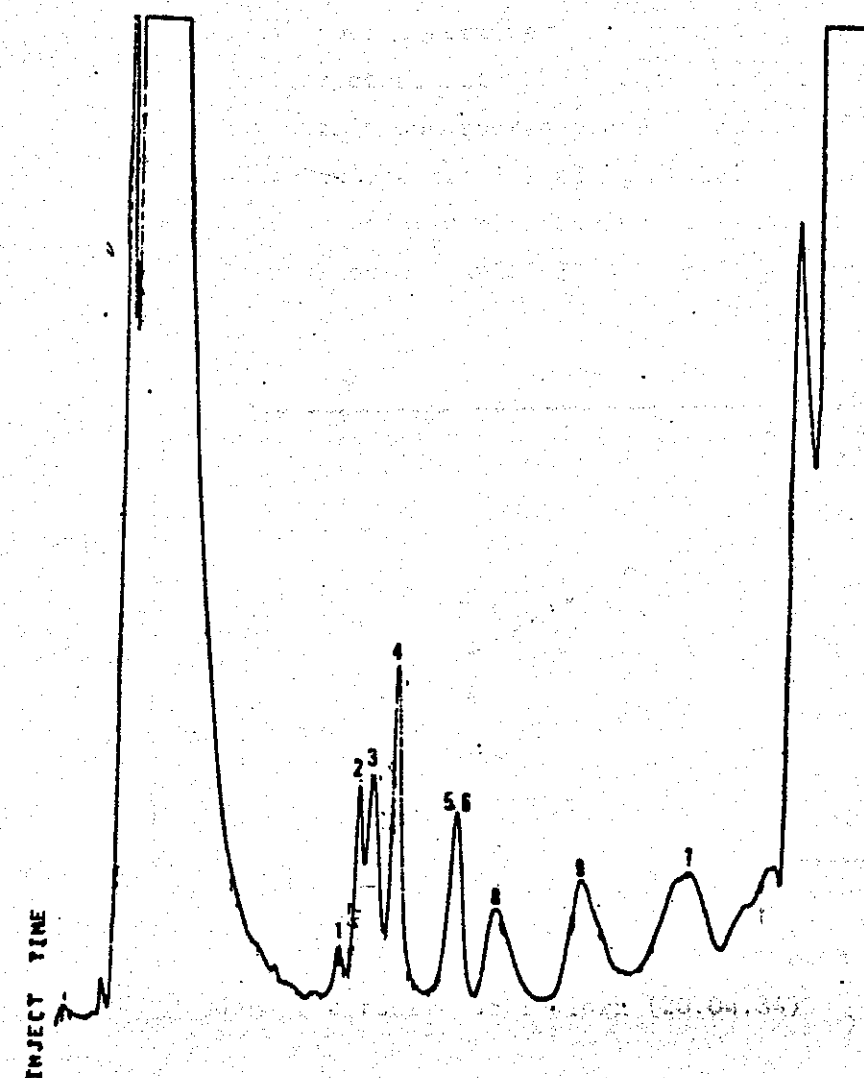


Figure 9 Chromatogramme du hydrolysate du matériel particulaire
Conditions (cf. Fig. 8)

Le fait que la distribution des monosaccharides soit semblable, dans le matériel particulaire, indiquerait l'existence d'un apport commun dans ces deux estuaires à cette époque de l'année.

Nous observons que le glucose n'est pas le monosaccharide le plus abondant des échantillons analysés. Ceci est en contradiction avec les résultats publiés sur différentes régions (18,35,45,44).

Nous ne pouvons pas expliquer ces "anomalies" et des études plus approfondies devront être entreprises sur ces deux estuaires afin de pouvoir localiser les sources et le devenir des monosaccharides dans cette région. Néanmoins, MOPPER (2), montre que le matériel terrestre est riche en glucose et pauvre en ribose ; tandis que les débris du plancton, bien que contenant du glucose, sont relativement riches en ribose et il utilise le rapport glucose/ribose comme un indicateur paléoenvironnemental pour déterminer les proportions relatives sur les sources terrigènes et planctoniques dans le sédiment. Un apport inférieur à 5 indiquerait une source planctonique. Or, dans nos résultats, ce rapport varie entre 1,9 et 5, ce qui indiquerait un apport important provenant des débris planctoniques, ceci serait confirmé par la corrélation existante entre les CHOPT et la phéophytine (fig. 10).

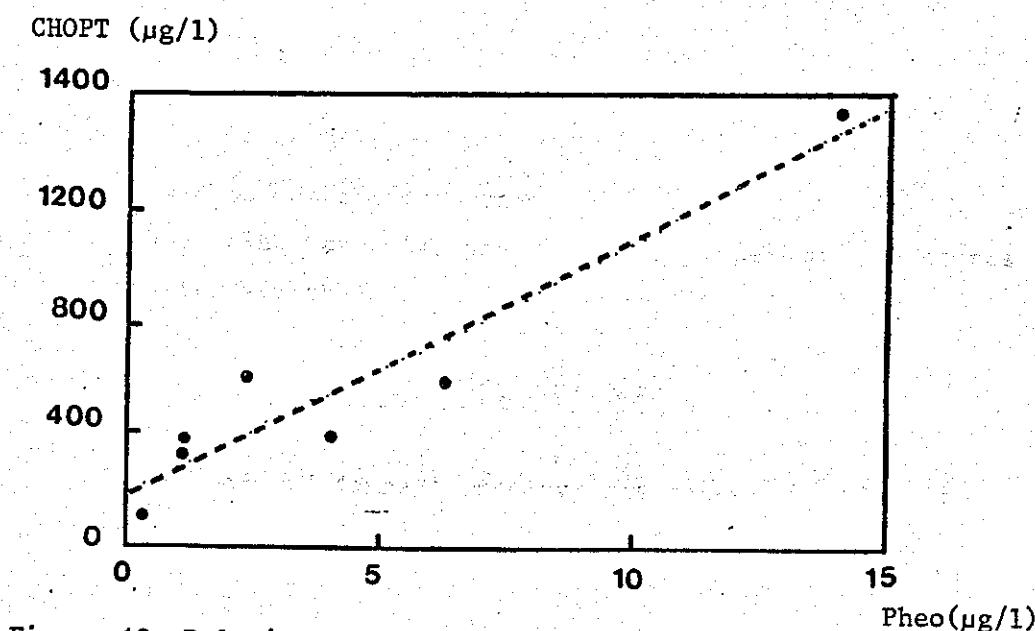
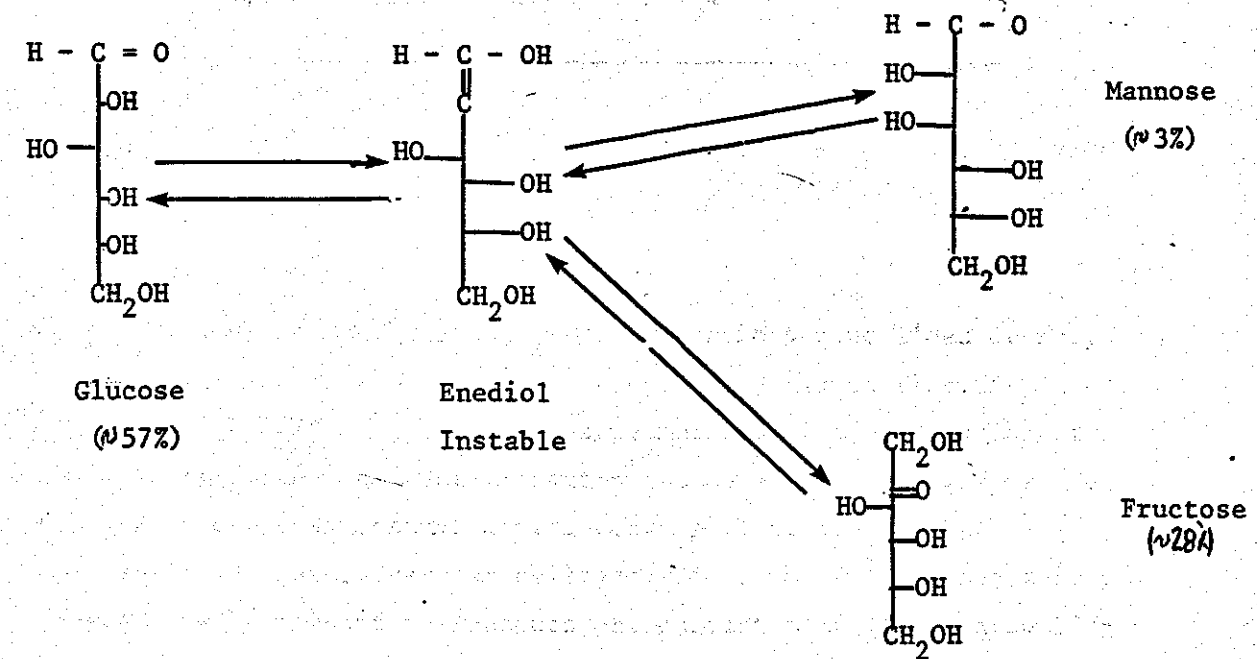


Figure 10 Relation entre les valeurs de CHOPT et de Phéophytine dans l'estuaire de l'Elorn (20.04.84)

En outre, ce même auteur expose la possibilité de la transformation du glucose en fructose et en mannose par des processus abiotiques "in situ". Cette transformation ayant lieu par énoilisation en milieu faiblement alcalin (transformation de Lobry de Bruynalberda Van Ekenstein) selon :



dans MOPPER (2).

Mais dans nos chromatogrammes nous ne détectons pas le fructose, car il est élué avec les pentoses, ce qui ne nous permet pas de vérifier cette hypothèse.

V-4 LES OSES DANS L'EAU DE MER

Le tableau IV donne le spectre des monosaccharides dans deux échantillons d'eau de mer hydrolysés.

St.	GAL	GLU	MAN	ARA + XYL + FRUC	RIB	RHA
4	3.12	5.05	Nd	15.48	1.92	8.23
8	6.02	3.66	15.04	21.74	Nd	Nd

Tableau IV Carbohydrates dans l'eau de mer filtrée après hydrolyse
µg/l.

Nous n'avons analysé que deux stations pour l'eau de mer. Ceci est dû aux problèmes rencontrés pour sa détermination. En effet, l'analyse des CHOD fait appel à des techniques de concentration et de dessalement; techniques qui peuvent provoquer une pollution des échantillons. Nous avons observé dans le cas de l'utilisation des résines, une adsorption des sucres sur celles-ci. C'est pour palier à cet inconvénient que la plupart des auteurs préconisent l'utilisation de l'électrodialyse comme méthode d'élimination des sels (3,39,38).

La figure 11 a montre le chromatogramme de la station 8; chromatogramme obtenu après dessalement de l'eau. La figure 11 b montre le chromatogramme du même échantillon non dessalé. On observe la faible résolution des pics et un élargissement de ceux-ci.

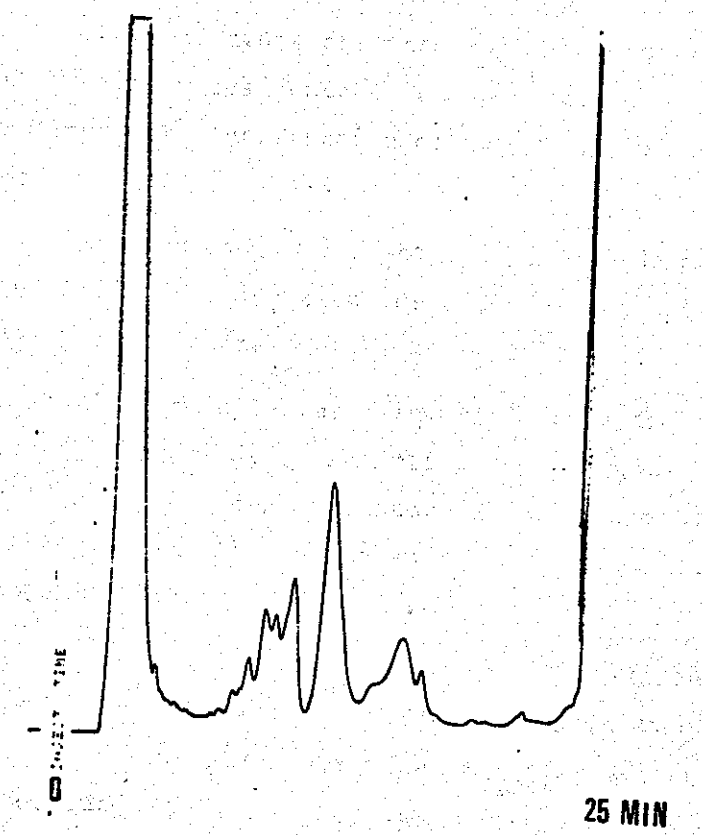
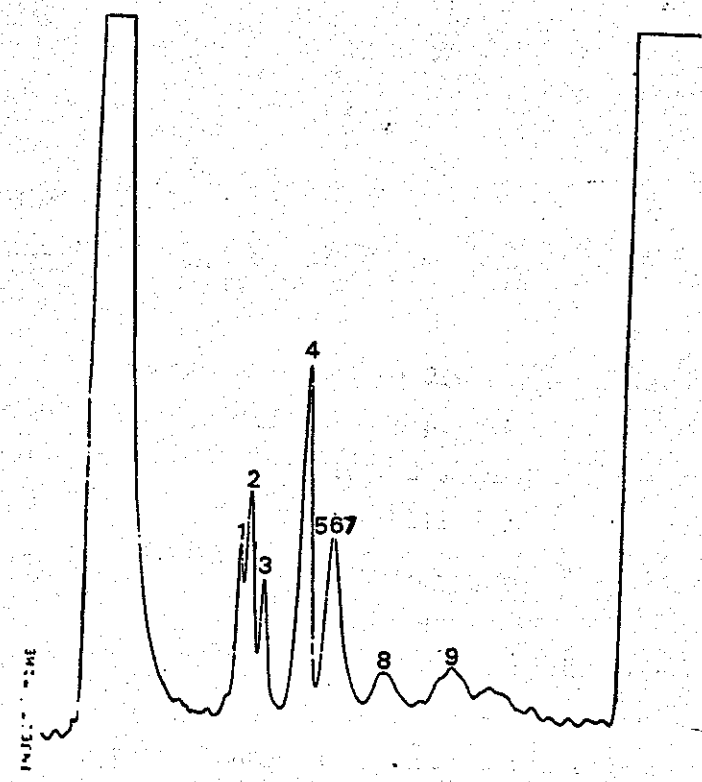


Figure 11 Chromatogramme d'un hydrolysat d'eau de mer.
 a) après dessalement b) même échantillon non dessalé
 Conditions expérimentales (cf. IV-3 et Figure 8)

CONCLUSION

La méthode de dosage des sucres présentée ici offre un certain nombre d'avantages. En premier lieu, elle est assez sensible puisqu'elle permet de mesurer des quantités de l'ordre de 0,1 µg injecté. De plus, cette sensibilité peut être améliorée en utilisant un fluorimètre. Néanmoins, son application à la mesure des CHOD libres nécessitera encore de faire appel à des étapes préalables de dessalement et de concentration. Il ne sera possible de s'en affranchir que s'il s'avère possible de concentrer les dérivés Dns sur une pré-colonne ou en tête d'une colonne phase inverse, ce qui reste à vérifier.

Les conditions chromatographiques employées, ne permettent pas la résolution des pentoses et du fructose. Celle-ci pourrait être obtenue par l'utilisation de colonnes plus polaires, comme les phényles.

L'obtention du chromatogramme demande moins de 30 minutes et en variant les proportions de l'éluant, le dosage des acides uroniques et des sucres méthylés pourrait être envisageable.

L'effet de la phase inverse (ou hydrophobique) est le mécanisme principal de la rétention des sucres. Un second mécanisme serait l'adsorption due aux interactions (ex. liaisons hydrogènes) entre les groupements hydroxyles des sucres et les groupes silyanols restés libres sur la silice (2).

Dans les conditions de réaction utilisées pour la dérivation des sucres, la Dns-hydrazine peut réagir avec tous les composés carbonylés, en particulier, les aldéhydes, les cétones simples et les céto-stéroïdes.

Cependant, ces dérivés, étant beaucoup plus hydrophobes, seront élués à des temps de rétention relatifs beaucoup plus grands que les dérivés des sucres (34).

Les composés carbonylés peuvent interférer avec la dérivatation des sucres, car ils consomment du réactif. Néanmoins, cette interférence peut être évitée par l'utilisation d'une solution de Dns-hydrazine en large excès.

Bien qu'une dérivatation post-colonne puisse entraîner une perte de résolution de certains oses, cette méthode présente l'avantage d'être facilement automatisable.

Pour les deux estuaires étudiés, les stations analysées ne montrent pas des variations, qualitatives, dans leurs compositions, ce qu'indiquerait une source majoritaire et commune des glucides à cette époque de l'année (au printemps).

Les valeurs du rapport glucose/ribose et ceux du rapport I/S montrent, à priori, que cette source serait la décomposition du plancton. Cependant, nous devons continuer les études et augmenter le nombre de mesures afin de pouvoir vérifier cette hypothèse.

Les carbohydrates se présentent donc, comme indicateurs d'origine de la matière organique dans le milieu marin.

- BIBLIOGRAPHIE -

1. PARSONS, T.R., STEPHENS, K. and STRICKLAND, J.D.H., 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 18(6):1001-1016.
2. MOPPER, K., 1980. Carbohydrates in the marine environment : recent developments In : DAUMAS, R. (ed.), *Biogéochimie de la matière organique à l'interface eau-sédiment marin*. Editions du CNRS;71-80.
3. MOPPER, K., DAWSON, R., LIEBEZEIT, G., and ITTEKKOT, V., 1980. The monosaccharide spectra of natural waters. *Mar. Chem.*, 10:55-66.
4. WALSH, G.E., 1965. Studies on dissolved carbohydrate in Cap Cod waters. I. General survey. *Limnol. Oceanogr.*, 10:570-576.
5. BIGGS, R.B. and WETZEL, C.D., 1968. Concentration on particulate carbohydrate at the halocline in Chesapeake Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 13:169-171.
6. JOSEFSSON, B., UPPSTROM, L., and OSTTING, G., 1972. Automatic spectrophotometric procedures for the determination of the total amount of dissolved carbohydrates in sea water. *Deep-Sea Res.*, 19:385-395.
7. Mc FEETERS, R.F., 1980. A manual method for reducing sugar determination with 2,2'-bichinchonate reagent. *Anal. Biochem.*, 103:302-306.
8. MOPPER, K. and DEGENS, E.T., 1972. A new chromatographic sugars analyzer with a sensitivity of 10^{-10} moles. *Anal. Biochem.*, 45:147-153.
9. KIDBY, D.K., and DAVIDSON, D.J., 1973. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.*, 55:321-325.

10. LEVER, M., 1973. Colorimetric and fluorimetric carbohydrate determination with P-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochem.Med.*, 7:274-281.
11. HONDA, S., KAKOMOTO, K., SUDO, K., KAKEHI, K. and TAKIURA, K., 1974. Fluorimetric determination of reducing sugars with ethylene-diamine sulfate. *Anal.Chim.Acta.*, 70:133-139.
12. HONDA, S., MATSUDA, Y., TAKAHISHI, M., and KAKEHI, K., 1980. Fluorimetric determination of reducing carbohydrate with 2-cyanoacetamide and application to automated analysis of carbohydrates as borate complexes. *Anal.Chem.*, 52:1079-1082.
13. ROGER, C.J., CHAMBERS, C.W., and CLARKE, H.A., 1966. Rapid spectro-fluorimetric method for determining nanogram quantities of carbohydrates. *Anal.Chem.*, 38(13):1851-1853.
14. HANSON, R.B. and SNYDER, J., 1979. Enzymatic determination of glucose in marine environments : improvement and note of caution. *Mar.Chem.*, 7:353-362.
15. MICHALSKI, E., CZARNECKI, K. and IGNACZAK, M., 1960. Amperometric determination of glucose, fructose and saccharose at zero applied potential. *Talanta*. 5:137-140.
16. JOHNSON, K.M., BURNEY, C.M. and SIEBURTH, J.McN., 1981. Doubling the production and precision of the MBTH spectrophotometric assay for dissolved carbohydrates in seawater. *Mar.Chem.*, 10:467-473.
17. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chem.*, 28(3):350-356.
18. HANNA, H. and TOMINAGA, H., 1969. A detailed analysis of carbohydrates in marine particulate matter. *Mar.Biol.*, 2:223-235.
19. HITCHCOCK, G.L., 1977. The concentration of particulate in a region of the West Africa Upwelling zone during March 1974. *Deep-Sea Res.*, 24(1):83-93.
20. BIRRIEN, J.L. et VIDEAU, C., 1983. Etude du phytoplancton dans les zones frontales de l'Iroise. *Rapp.Scient.* 1ère partie, 66 p.

21. DELMAS, D., 1981. Matière organique de sédiments lagunaires (Etang de Berre) ; Etude des glucides en tant qu'indicateurs de l'origine et de l'évolution de la matière organique. Thèse 3ème cycle. Fac. Sci. Luminy. 101p.

22. GERCHAKOV, S.M. and HATCHER, P.G., 1972. Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 17(6):938-943.

23. DELMAS, D., 1983. Les glucides et l'évolution de la matière organique dans les sédiments marins. *Oceanol. Acta.*, 6(2):157-165.

24. EBERLEIN, K. and HAMMER, K.D., 1980. Automatic determination of total carbohydrates in sea water. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 301:17-19.

25. PAZUR, J.H. and DREKER, K.L., 1980. Microenzymic procedures for the identification of carbohydrates In : WHISTLER R.L. and BE MILLER (eds.), *Methods in carbohydrate chemistry*. Vol. VIII, Academic Press., 139-143.

26. MURATA, K., 1980 Enzymic analysis of acidic glycosaminoglycans. In : WHISTLER, R.L. and BE MILLER (Eds.), *Methods in carbohydrate Chemistry*. Vol. VIII, Academic Press., 81-88.

27. JANDERA, P. and CHURACEK, J., 1974. Ion-exchange chromatography of aldehydes, ketons, ethers, alcohols, polyols and saccharides. *J. Chromatogr.*, 98:55:104.

28. MOSIHYZZAMAN, M., THEANDER, O. and AMAN, P., 1982. Analysis of carbohydrates in the jute plant (*Corchorus capsularis*). *J. Sci. Food Agric.*, 33:1207-1212.

29. LEHRFELD, J., 1981. Differential gas-liquid chromatography method for determination of uronic acids in carbohydrate mixtures. *Anal. Biochem.*, 115:410-410.

30. GANDELMAN, M.S. and BURKS, J.W., 1983. Liquid chromatographic detection of cardiac glucosides, saccharides and hydrocortisone based on the photoreduction of 2-tert-butyl-anthraquinone. *Anal. Chim. Acta.*, 155:159-171.

31. THOMPSON, R.H., 1978. Analysis of mono- and disaccharides by high performance liquid chromatography of the benzyloxime-perbenzoyl-derivatives. *J. Chromatogr.*, 166:201-212.

32. KLOAREG, B., 1982. Séparation et dosage du L-fucose et du D-xylose par chromatographie liquide à haute pression. Application à l'analyse des polysaccharides sulfurylés des algues brunes. *J. Chromatogr.*, 236:217-223.

21. DELMAS, D., 1981. Matière organique de sédiments lagunaires (Etang de Berre) ; Etude des glucides en tant qu'indicateurs de l'origine et de l'évolution de la matière organique. Thèse 3ème cycle. Fac. Sci. Luminy. 101p.

22. GERCHAKOV, S.M. and HATCHER, P.G., 1972. Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 17(6):938-943.

23. DELMAS, D., 1983. Les glucides et l'évolution de la matière organique dans les sédiments marins. *Oceanol. Acta.*, 6(2):157-165.

24. EBERLEIN, K. and HAMMER, K.D., 1980. Automatic determination of total carbohydrates in sea water. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 301:17-19.

25. PAZUR, J.H. and DREKER, K.L., 1980. Microenzymic procedures for the identification of carbohydrates In : WHISTLER R.L. and BE MILLER (eds.), *Methods in carbohydrate chemistry*. Vol. VIII, Academic Press., 139-143.

26. MURATA, K., 1980 Enzymic analysis of acidic glycosaminoglycans. In : WHISTLER, R.L. and BE MILLER (Eds.), *Methods in carbohydrate Chemistry*. Vol. VIII, Academic Press., 81-88.

27. JANDERA, P. and CHURACEK, J., 1974. Ion-exchange chromatography of aldehydes, ketons, ethers, alcohols, polyols and saccharides. *J. Chromatogr.*, 98:55:104.

28. MOSIHYZZAMAN, M., THEANDER, O. and AMAN, P., 1982. Analysis of carbohydrates in the jute plant (*Corchorus capsularis*). *J. Sci. Food Agric.*, 33:1207-1212.

29. LEHRFELD, J., 1981. Differential gas-liquid chromatography method for determination of uronic acids in carbohydrate mixtures. *Anal. Biochem.*, 115:410-410.

30. GANDELMAN, M.S. and BURKS, J.W., 1983. Liquid chromatographic detection of cardiac glucosides, saccharides and hydrocortisone based on the photoreduction of 2-tert-butyl-anthraquinone. *Anal. Chim. Acta.*, 155:159-171.

31. THOMPSON, R.H., 1978. Analysis of mono- and disaccharides by high performance liquid chromatography of the benzyloxime-perbenzoyl-derivatives. *J. Chromatogr.*, 166:201-212.

32. KLOAREG, B., 1982. Séparation et dosage du L-fucose et du D-xylose par chromatographie liquide à haute pression. Application à l'analyse des polysaccharides sulfurylés des algues brunes. *J. Chromatogr.*, 236:217-223.

ALPENFELS, W.F., MATHEWS, R.A., MADDEN, D.E. and NEWSON, A.E., 1982. The rapid determination of neutral sugars in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Liquid Chromatogr.*, 5(9):1711-1723.

MOPPER, K. and JOHNSON, L., 1983. Reversed-phase liquid chromatographic analysis of Dns sugars. Optimization of derivatization and chromatographic procedures and applications to natural samples. *J. Chromatogr.*, 256:27-38.

DEGENS, E.T., REUTER, J.H. and SHAW, K.N.F., 1964. Biochemical compounds in offshore California sediments and sea waters. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 28:45-66.

YAMAOKA, Y., 1983. Carbohydrates in humic and fulvic acids from Hiroshima Bay sediments. *Mar. Chem.*, 13:227-237.

HANDA, N. and YANAGI, K., 1969. Studies on water extractables carbohydrates of the particulate matter from the Northwest Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, 4:197-207.

JOSEFSSON, B.O., 1970. Determination of soluble carbohydrates in seawater by partition chromatography after desalting by ion-exchange membrane electro dialysis. *Anal. Chim. Acta.*, 52:65-73.

MOPPER, K., 1977. Sugars and uronic acids in sediment and water from the Black Sea and North Sea with emphasis on analytical techniques. *Mar. Chem.*, 5:585-603.

BAUER, H. and VOELTER, W., 1976. Ion exchange chromatography of carbohydrates. *Chromatographia*, 9(9):433-439.

D'AMBOISE, M., NOEL, D. and HANAI, T., 1980. Characterization of bonded-amine packing for liquid chromatography and high-sensitivity determination of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 79:1-10.

MOPPER, K. and GINDLER, E.M., 1973. A new noncorrosive dye reagent for automatic sugar chromatography. *Anal. Biochem.*, 56:440-442.

GRIMBLE, G.K., BARKER, H.M. and TAYLOR, R.H., 1983. Chromatographic analysis of sugars in physiological fluids by post-column reaction with cuprammonium: A new and highly sensitive method. *Anal. Biochem.*, 128:422-428.

LAANE, R.W.P.M., 1982. Chemical characteristics of the organic matter in the water phase of the EMS-Dollart Estuary. Doctoral Thesis. BOEDE, N°6, Publications en Verslagenp. 143.

HANDA, N., HANAGI, K., and MATSUMAGA, K., 1972. Distribution of detrital materials in the Western Pacific Ocean and their biochemical nature. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 29 suppl.:53-71.

ALPENFELS, W.F., MATHEWS, R.A., MADDEN, D.E. and NEWSON, A.E., 1982. The rapid determination of neutral sugars in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Liquid Chromatogr.*, 5(9):1711-1723.

MOPPER, K. and JOHNSON, L., 1983. Reversed-phase liquid chromatographic analysis of Dns sugars. Optimization of derivatization and chromatographic procedures and applications to natural samples. *J. Chromatogr.*, 256:27-38.

DEGENS, E.T., REUTER, J.H. and SHAW, K.N.F., 1964. Biochemical compounds in offshore California sediments and sea waters. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 28:45-66.

YAMAOKA, Y., 1983. Carbohydrates in humic and fulvic acids from Hiroshima Bay sediments. *Mar. Chem.*, 13:227-237.

HANDA, N. and YANAGI, K., 1969. Studies on water extractables carbohydrates of the particulate matter from the Northwest Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, 4:197-207.

JOSEFSSON, B.O., 1970. Determination of soluble carbohydrates in seawater by partition chromatography after desalting by ion-exchange membrane electro dialysis. *Anal. Chim. Acta.*, 52:65-73.

MOPPER, K., 1977. Sugars and uronic acids in sediment and water from the Black Sea and North Sea with emphasis on analytical techniques. *Mar. Chem.*, 5:585-603.

BAUER, H. and VOELTER, W., 1976. Ion exchange chromatography of carbohydrates. *Chromatographia*, 9(9):433-439.

D'AMBOISE, M., NOEL, D. and HANAI, T., 1980. Characterization of bonded-amine packing for liquid chromatography and high-sensitivity determination of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 79:1-10.

MOPPER, K. and GINDLER, E.M., 1973. A new noncorrosive dye reagent for automatic sugar chromatography. *Anal. Biochem.*, 56:440-442.

GRIMBLE, G.K., BARKER, H.M. and TAYLOR, R.H., 1983. Chromatographic analysis of sugars in physiological fluids by post-column reaction with cuprammonium: A new and highly sensitive method. *Anal. Biochem.*, 128:422-428.

LAANE, R.W.P.M., 1982. Chemical characteristics of the organic matter in the water phase of the EMS-Dollart Estuary. Doctoral Thesis. BOEDE, N°6, Publications en Verslagenp. 143.

HANDA, N., HANAGI, K., and MATSUMAGA, K., 1972. Distribution of detrital materials in the Western Pacific Ocean and their biochemical nature. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 29 suppl.:53-71.