



Fondation pour la culture
scientifique et technique

Sciences à l'École



Un détecteur de chlorophylle pour sauver Maurice le poisson rouge

Le projet des Argonautes

RAVIZZA Léa
OBRY-HEBERT Mélanie
MOUHAMAD-DAVOUSSE Jouvairiya
KERBORIOU Loïc
GOUX Quentin
GARAT Cassius

Professeurs encadrant :

LEFEVRE Yoann (physique-chimie)

OLIVEIRA Valérie (SVT)

Lycée G. St Hilaire - Etampes

Un détecteur de chlorophylle

Année 2013

SOMMAIRE

I. LA CHLOROPHYLLE, UNE MOLECULE AUX PROPRIETES PARTICULIERES	4
1) Relation entre chlorophylle et biomasse	4
2) Chlorophylle et fluorescence	4
3) Extraction et analyse spectrale de la chlorophylle	5
a) Les différents pigments chlorophylliens	5
b) Extraction de la chlorophylle A par chromatographie sur colonne	6
c) Spectrophotométrie	7
II. LA DETECTION DE LA CHLOROPHYLLE	8
1) La conception du prototype du détecteur de chlorophylle	8
2) Une première tentative d'étalonnage	9
3) Miniaturisation du circuit	10
III. LA POLLUTION ET SON IMPACT SUR LA BIOMASSE DANS L'EAU	11
1) La station d'épuration	11
2) Pollution et rivière d'Etampes	12
3) Notre démarche expérimentale	13
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	15
SITOGRAFIE ET PARTENAIRES	16

La station d'épuration rejette-t- elle de l'eau polluée dans la rivière d'Etampes ?

I. LA CHLOROPHYLLE, UNE MOLECULE AUX PROPRIETES PARTICULIERES

1) Relation entre chlorophylle et biomasse

La chlorophylle A (il existe aussi la chlorophylle B) est un pigment présent dans toutes les plantes vertes. Tous les végétaux chlorophylliens sont des êtres autotrophes, capables de réaliser la photosynthèse. Ainsi, ils peuvent faire de la matière organique à partir de la matière minérale et sont à la base des chaînes alimentaires, notamment les chaînes alimentaires aquatiques.

La biomasse est la masse de matière organique qui constitue un être vivant (exprimée en masse de carbone). La production de matière organique à partir de matière minérale est possible grâce à la chlorophylle contenue dans les végétaux chlorophylliens. Ce pigment est capable de capter l'énergie lumineuse et permet sa conversion en énergie chimique utilisable par la cellule.

Par exemple, l'ensemble des biomasses produites par les organismes chlorophylliens au niveau des océans est presque entièrement due à des organismes unicellulaires microscopiques appartenant au phytoplancton.

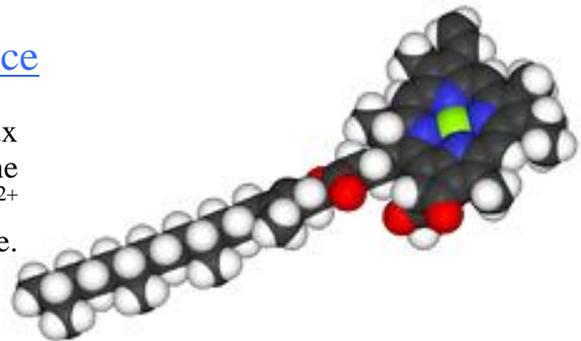
Il faut savoir que chez les végétaux vivants, la chlorophylle est contenue dans les chloroplastes et n'est donc pas accessible à un capteur de chlorophylle. Cependant, à la mort du phytoplancton, les chloroplastes sont détruits et libèrent la chlorophylle dans le milieu. Cette chlorophylle libre garde ses propriétés encore quelques temps.

C'est cette chlorophylle libre, dont la quantité est proportionnelle à la biomasse, que notre capteur va détecter.

Ainsi, La concentration en chlorophylle dans un milieu aquatique est révélatrice de la présence d'êtres vivants, donc de la biomasse.

2) Chlorophylle et fluorescence

La molécule de chlorophylle est composée de deux parties : une « queue » hydrophobe et une « tête » composée notamment d'un ion Mg^{2+} impliqué dans l'absorption de l'énergie lumineuse. Il s'agit d'une molécule faiblement polaire.

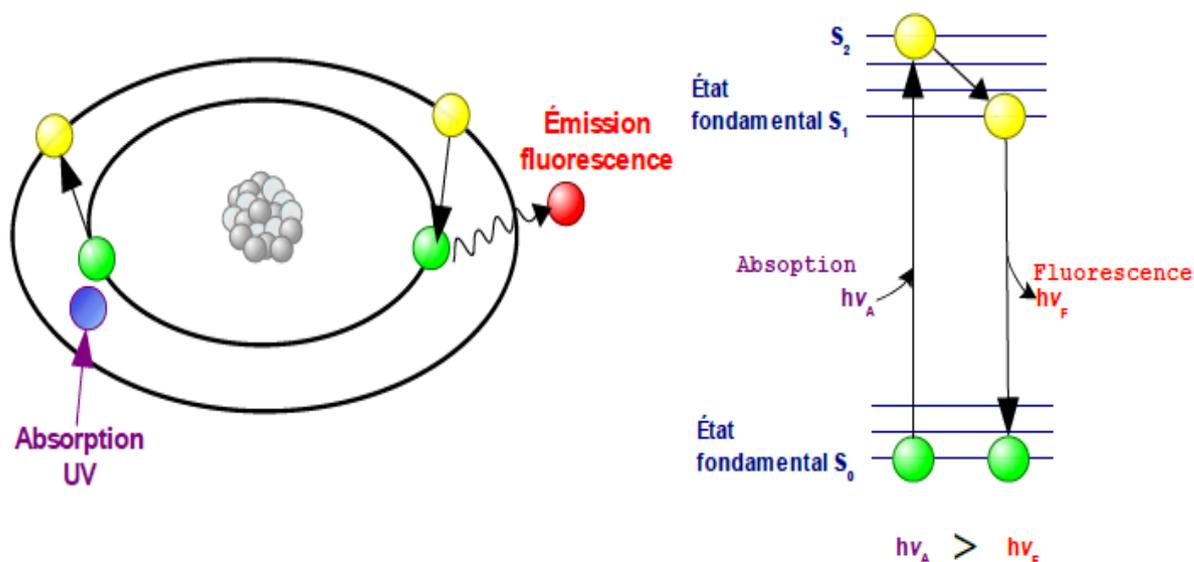


Molécule de chlorophylle A

Si nous avons choisi la chlorophylle A, c'est pour une de ses caractéristiques principales : la fluorescence.

Lorsque la chlorophylle absorbe la lumière, certains électrons des atomes qui la composent absorbent l'énergie lumineuse. L'absorption se fait plutôt dans le bleu (fréquence élevée ou

faible longueur d'onde). Ceci a pour effet d'amener certains électrons de la molécule dans un état excité. Cet état, très instable, ne dure que 10 ns et les électrons reviennent spontanément à leur état initial en passant par un état intermédiaire.



Le passage par cet état intermédiaire fait que la lumière réémise pour la désexcitation a une fréquence plus faible (plutôt dans le rouge). La longueur d'onde émise est donc différente de la longueur d'onde absorbée : c'est le phénomène de fluorescence. Nous allons utiliser sa propriété de fluorescence pour détecter la chlorophylle.

Nous avons souhaité vérifier ces propriétés de la chlorophylle avant de mettre en place notre détecteur. Il a donc fallu réaliser un spectre d'absorption de la chlorophylle.

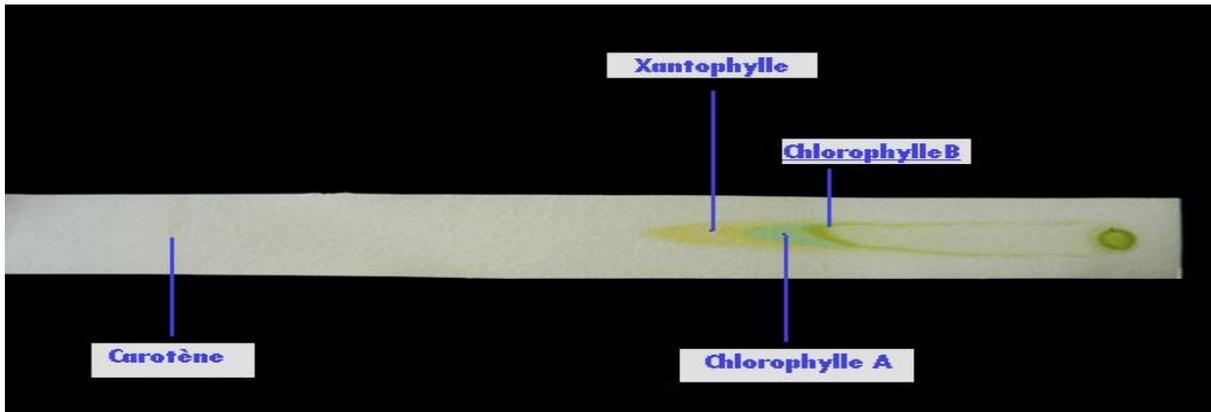
3) Extraction et analyse spectrale de la chlorophylle

Afin de réaliser le spectre d'absorption de la chlorophylle A, il a d'abord fallu en extraire à partir de végétaux.

a) Les différents pigments chlorophylliens

Puisque la chlorophylle est un pigment se trouvant dans toutes les plantes vertes, nous avons broyé des épinards, des orties ou du persil, pour ainsi casser les cellules contenant la chlorophylle. Nous l'avons fait dans un mortier avec de l'éthanol, solvant dans lequel la chlorophylle est soluble.

Puis nous avons filtré le broyat afin de récupérer les pigments de la plante. Enfin, nous avons fait des chromatographies sur papier et sur couche mince afin de distinguer les différents pigments qui composent ces plantes vertes. Après avoir appliqué une goutte de filtrat sur du papier Whatman, nous l'avons mis dans une cuve contenant un éluant judicieusement choisi (éther de diéthyle/éther de pétrole).



Nous avons constaté la présence de quatre traces différentes. Nous en avons déduit que les plantes vertes contiennent quatre pigments. Avec un livre, nous avons pu les identifier. Il y a : les carotènes, les xanthophylles, la chlorophylle A et la chlorophylle B. Ces pigments sont différenciés grâce à leurs couleurs et à leur distance de migration par rapport au dépôt.

Après avoir identifié les différents pigments des plantes vertes, nous avons voulu les séparer afin de réaliser le spectre d'absorption.

b) Extraction de la chlorophylle A par chromatographie sur colonne

Le mélange des pigments extrait des orties dans l'éthanol a été chauffé doucement dans un cristalliseur de manière à ce que l'éthanol s'évapore et que les pigments chlorophylliens soient concentrés. Puis, ils sont de nouveau dissous dans l'éluant utilisé pour la migration dans la colonne.

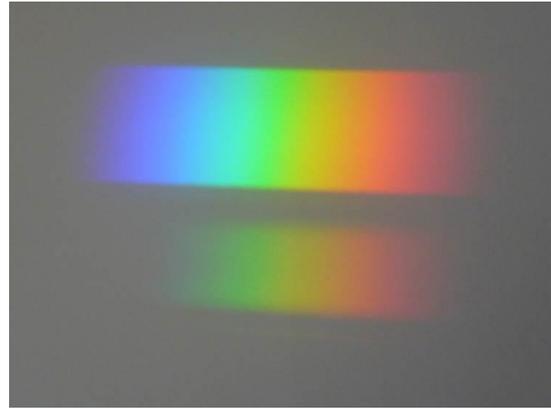
Nous avons tout d'abord essayé sur une colonne de silice avec de l'éluant, mais il n'y a eu aucune migration. Nous avons ensuite opté pour la chromatographie sur colonne avec du sable de Fontainebleau (sable très fin) comme phase fixe.

Il faut tout d'abord remplir la colonne de sable en faisant attention à ne laisser aucune bulle d'air. Puis nous avons déposé quelques millilitres du filtrat obtenu précédemment. Les pigments, entraînés par l'éluant (sous l'effet de la gravité), migrent à des vitesses différentes du fait de leur composition. Ils arrivent en bas de la colonne séparément ce qui nous permet de les récupérer dans des béchers différents.



c) Spectrophotométrie

Tout d'abord nous avons voulu comparer le spectre de lumière blanche et le spectre d'absorption de notre chlorophylle A extraite sur colonne. Avec un rétroprojecteur, nous avons placé sur la source de lumière blanche une cuve contenant de la chlorophylle. Grâce à un réseau, nous avons pu décomposer les deux lumières et les afficher sur un écran.

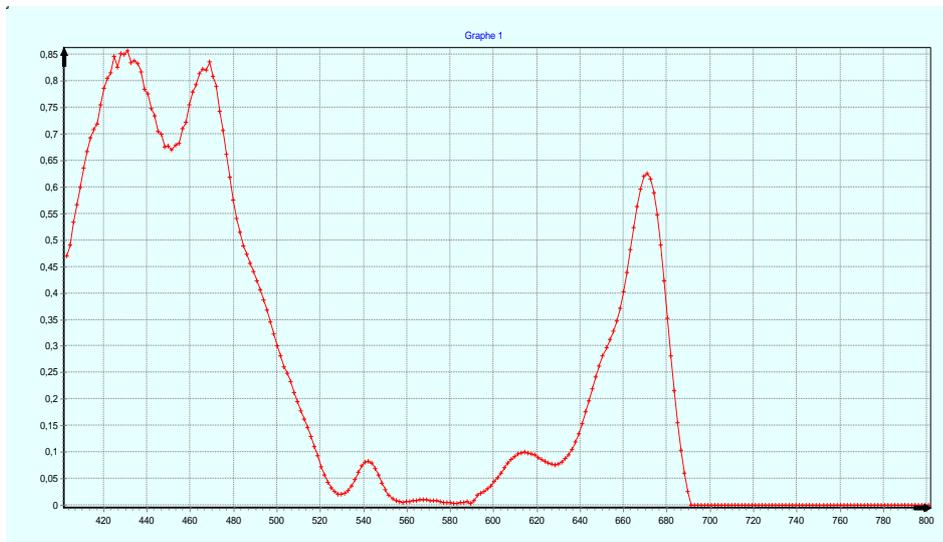


On constate qu'il y a une absence de bleu et de rouge dans le spectre d'absorption de la chlorophylle. Ceci signifie que la solution a absorbé les longueurs d'ondes correspondantes.

Après avoir eu une idée grossière de ce que nous pouvions obtenir du spectre d'absorption de la chlorophylle, nous avons décidé de soumettre notre extrait à un spectrophotomètre.

Voici le résultat :

Absorbance



Longueur d'onde en nm

Nous constatons que les longueurs d'onde aux alentours de 430 nm (bleu) et 680 nm (rouge) ont été absorbées. Le premier pic d'absorbance est conforme aux prévisions de l'étude théorique sur la fluorescence (le second l'est un peu moins, nous ne nous y attendions pas). Pour observer la fluorescence, il faudra bien éclairer la chlorophylle avec une lumière proche des ultraviolets (proche de 400 nm). Ce faisant, celle-ci devrait réémettre une lumière rouge, ce que nous allons essayer d'observer dans la partie suivante.

II. LA DETECTION DE LA CHLOROPHYLLE

Notre objectif étant d'évaluer la biomasse dans la rivière d'Etampes, il nous faut disposer d'un moyen de mesure du taux de chlorophylle. Avec les résultats de la partie précédente, nous avons conçu un détecteur de chlorophylle. Il s'agit de la partie « électronique » de notre dossier.

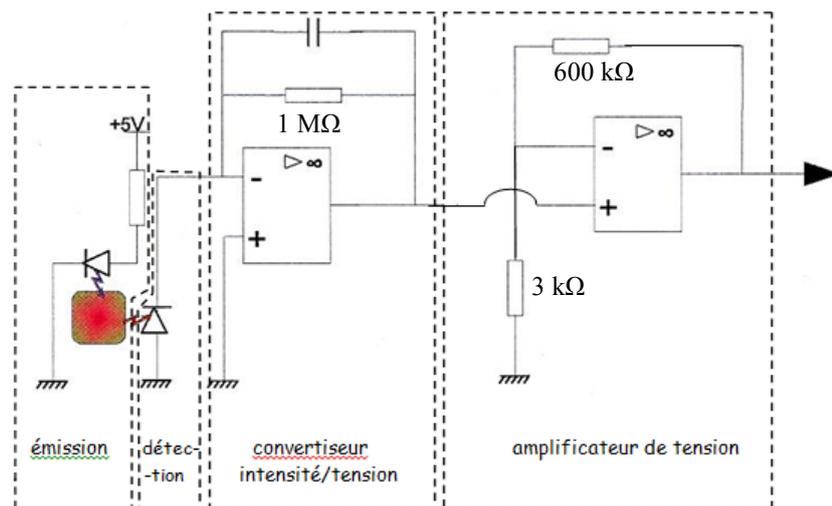
1) La conception du prototype du détecteur de chlorophylle

Pour exciter la chlorophylle d'un échantillon d'eau de rivière, nous avons choisi une DEL qui émet un rayonnement proche des UV et très sélectif (maximum à $400 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$). La société TENUM nous l'a envoyé gratuitement. Puis pour détecter la lumière de fluorescence ($\lambda \approx 665 \text{ nm}$), nous avons choisi une photodiode sélective (entre 630 et 690 nm). Expliquons les différentes parties de notre détecteur (voir schéma page suivante) :

Parties émission et détection :

Elle est composée de la DEL UV avec une résistance en série qui détermine le courant passant dans la DEL et donc l'intensité du rayonnement UV.

Pour la partie détection, la photodiode va transformer le rayonnement reçu en courant électrique.



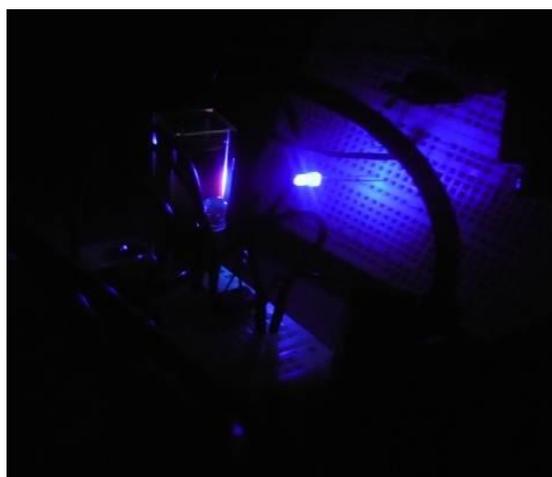
Partie amplification – conversion :

Le courant généré par la photodiode étant trop petit pour avoir des mesures pertinentes (de l'ordre 10^{-9} A), on va se servir d'un amplificateur convertisseur (gain de 10^6) qui a pour but de transformer l'intensité donnée par la photodiode en tension (de l'ordre de 10^{-3} V). Cette tension sera ensuite amplifiée par un amplificateur de tension (gain de 200) qui permettra d'obtenir une tension de l'ordre du volt, mesurable avec un simple voltmètre.

Partie alimentation symétrique :

Notre amplificateur (qui est en fait une réunion du convertisseur et de l'amplificateur), a besoin, pour bien fonctionner, d'une tension négative -5V . C'est pourquoi on se sert de ce

composant pour transformer la tension positive +5V en tension négative. Il faut savoir que notre détecteur sera alimenté par une simple pile de 9V à la suite de laquelle un RIT (Régulateur Intégré de Tension) a été installé.



Voici le prototype sur plaque d'essai et une photo du dispositif éclairée par la DEL UV.

2) [Une première tentative d'étalonnage](#)

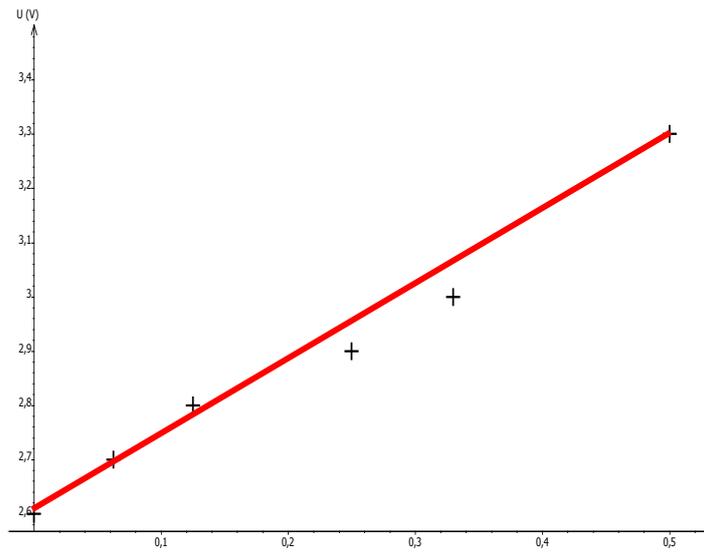
Nous avons tenté d'étalonner notre prototype de capteur avec des solutions de chlorophylle de concentrations croissantes. Pour se faire, nous avons utilisé non pas de la chlorophylle brute, mais un extrait de pigments chlorophylliens. Par dilutions successives nous avons réalisés une gamme étalon.



Cependant ce n'était qu'un premier étalonnage qui nous a permis de vérifier le fonctionnement de notre capteur ; un étalonnage plus rigoureux avec des solutions de concentrations plus proches de la réalité est en cours.

En voici les premiers résultats obtenus à partir d'une solution extraite de concentration notée C_0 (les solutions sont diluées d'un facteur x en abscisse sur les graphiques) :

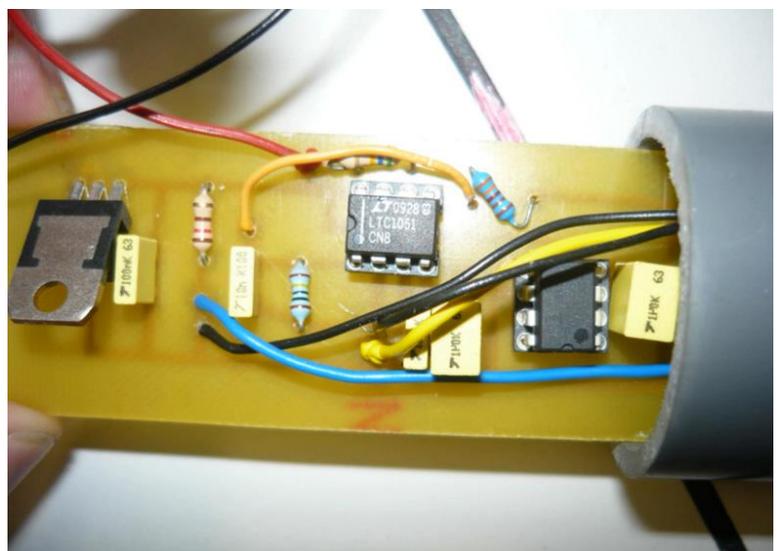
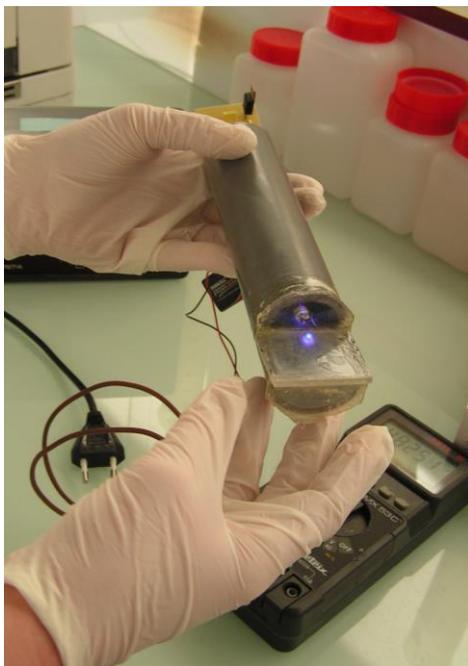
Tension en fonction de la concentration en chlorophylle



3) La miniaturisation du circuit

Pour la création de notre capteur, nous avons choisi la dimension de notre plaque pour que le capteur soit le plus petit possible. En effet, ce capteur doit être transportable sur le terrain. Il a ensuite fallu miniaturiser notre schéma pour l'adapter aux dimensions du tube contenant notre circuit.

Lors de la phase de production du circuit, nous avons mis sur transparent le schéma de notre circuit imprimé afin de pouvoir réaliser une gravure chimique. Le circuit réalisé, nous avons soudé les différents composants sur le circuit imprimé et finaliser notre capteur.



III. LA POLLUTION ET SON IMPACT SUR LA BIOMASSE DANS L'EAU

Afin de déterminer la qualité de l'eau d'une rivière, nous avons pensé à prélever un échantillon d'eau en amont et en aval d'une station d'épuration.

Pourquoi ?

Nous souhaitons savoir si cette station est efficace. Tout d'abord, nous allons cerner le fonctionnement d'une station d'épuration et la notion de « pollution », puis nous prélèverons de l'eau et nous réaliserons l'évaluation de cette biomasse ainsi que l'analyse de différents paramètres pour déterminer si elle est polluée.

1) La station d'épuration

Tout d'abord il faut préciser qu'une station d'épuration ne produit pas d'eau potable. Elle sert uniquement à dépolluer les eaux usées avant leur rejet dans une rivière. Qu'entendons-nous par « eaux usées » ? Ce sont des eaux résiduelles rejetées après usage industriel ou domestique. Etant polluées, les eaux usées sont donc traitées afin d'éliminer ces polluants indésirables.

Nous sommes allés dans la station d'épuration d'Etampes (annexe 2) où nous avons pu visiter le lieu et présenter à nos partenaires notre projet ainsi que pour y réaliser des mesures complémentaires (taux de nitrates et de phosphates).



La station d'épuration d'Etampes

Voici les différentes étapes que subit l'eau usée dans cette station :

Lorsque les eaux usées et les eaux pluviales arrivent à la station, un système de dégrillage permet d'éliminer les déchets les plus gros, les graviers et les sables.

L'eau passée dans les dégrilleurs passe ensuite dans des bassins de déshuilage où les graisses et huiles sont éliminées (elles sont moins denses donc surnagent, c'est l'aération du bassin qui permet leur flottation). Ces graisses sont ensuite traitées biologiquement par des bactéries spécifiques qui les dégradent en CO₂ et eau.

Une fois les matières solides retirées, l'eau est encore chargée en pollution dissoute. L'eau passe alors dans un bassin d'aération contenant des bactéries aérobies et anaérobies qui dégradent les pollutions carbonées et azotées.

La clarification permet ensuite d'éliminer les phosphates, puis de séparer les boues produites de l'eau (les boues plus lourdes que l'eau se déposent au fond du bassin de décantation).

Les boues récupérées seront déshydratées puis acheminées au centre de compostage pour être transformées.

Après traitement, l'eau épurée est rejetée dans la rivière par une bouche d'évacuation (photo).



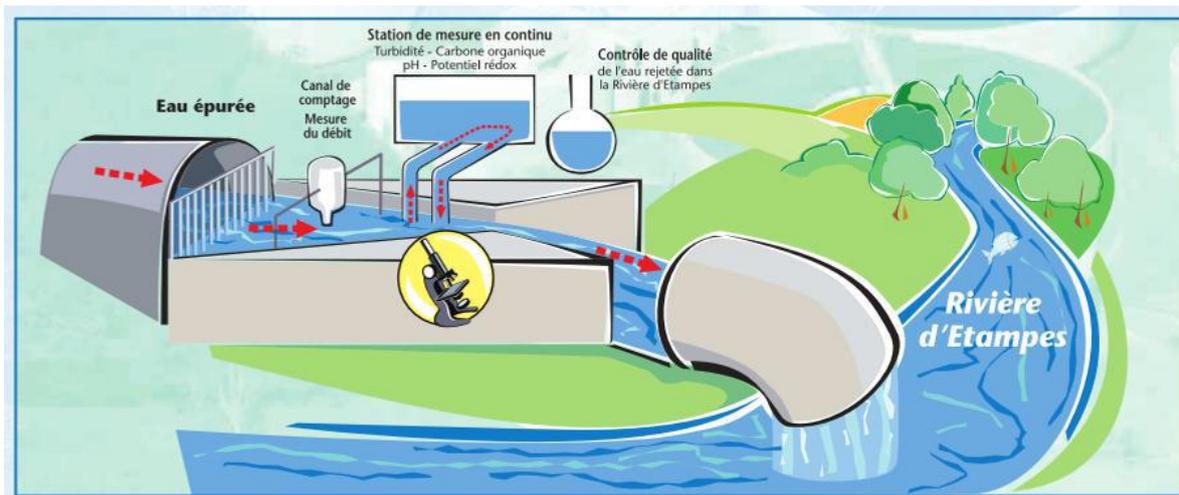
2) Pollution et rivière d'Etampes

Au sens large, la pollution désigne la dégradation d'un milieu naturel, comme celle due à l'activité humaine.

Les matières polluantes sont les métaux lourds, nitrates, phosphates, matière organique et bien d'autres encore.

C'est pourquoi les eaux usées doivent être retraitées au niveau de station d'épuration avant leur rejet dans le milieu naturel.

La rivière d'Etampes traverse notre ville et correspond à la rivière dans laquelle la station d'épuration rejette ses eaux épurées. Cette rivière nous intéresse dans la mesure où nous souhaitons évaluer l'impact de ses rejets sur la biomasse.



3) Notre démarche expérimentale

Problématique : La station d'épuration rejette-t-elle de l'eau polluée dans la rivière d'Etampes ?

Hypothèse : L'eau rejetée par la station contient des substances néfastes pour la biomasse.

Conséquence vérifiable : Si l'hypothèse est juste alors la biomasse est plus importante avant la station qu'après.

Expérimentation : Mesure de la biomasse avec le capteur, avant, après et au niveau du rejet de la station d'épuration.

Trois possibilités pour nos résultats :

Soit les résultats des mesures montrent une biomasse supérieure en aval par rapport à l'amont, soit la biomasse est inférieure en aval par rapport à l'amont de la station, soit les résultats sont identiques en amont et en aval. Ce sont ces résultats que nous interprétons.

Voici un exemple de résultats obtenus en milieu naturel, après des essais en aquarium.

	Lieu du prélèvement					
	Amont Rivière		Rejet Station épuration		Aval Rivière	
Concentration en mg/L de	25/01/2013	04/02/2013	25/01/2013	04/02/2013	25/01/2013	04/02/2013
Nitrates (NO_3^{2-})	6,8	6,8	0,6	1,5	6,4	7,1
Phosphates (PO_4^{3-})	0,15	0,22	0,10	0,19	0,13	0,17
Mesure avec le prototype (tension en volt)		0,11V		0,10V		0,13V
Mesure avec la plaque d'essais (tension en volt)	2,6V		2,5V		2,6V	

Cependant la question de la fiabilité de notre capteur se pose, c'est pour cela que nous comparons nos résultats à ceux obtenus par la société des eaux qui surveille cette zone : la SEE (Suez Environnement), ainsi qu'à ceux réalisés par la station d'épuration d'Etampes (SIARE).

Nous avons également réalisé des tests complémentaires pour éliminer tout cas de pollution aux nitrates et aux phosphates qui entraîne l'eutrophisation du milieu. En effet, notre démarche est basée sur une diminution de la biomasse lors d'une pollution en prenant comme référence les êtres vivants chlorophylliens. Cependant l'eutrophisation correspond à la prolifération d'algues ayant pour conséquence une diminution de l'oxygène dissous, donc un appauvrissement de la faune et la flore de la rivière, pourtant dans ce cas la concentration en chlorophylle augmente. Ces tests nous permettrons donc d'interpréter correctement nos résultats.

Toutefois, ce qui est important c'est la différence entre les valeurs en amont et en aval et non les valeurs absolues des mesures.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La réalisation de notre capteur étant terminée après de nombreuses difficultés (gravures du circuit imprimé, court-circuit, pannes...), nous avons réalisé quelques mesures sur le terrain, qu'il nous faudra renouveler régulièrement afin d'obtenir des valeurs représentatives permettant une interprétation. Un nouvel étalonnage de notre capteur sera aussi nécessaire. Les tests complémentaires (taux de nitrates, de phosphates) nous permettent de balayer un champ plus large de pollution et de faire éventuellement le lien avec la présence plus ou moins importante de biomasse.

Actuellement nous avons commencé la conception d'une nouvelle version de notre capteur prenant en compte les difficultés rencontrés avec la version actuelle : il nous faut rapprocher les diodes, prévoir un cache afin d'éliminer l'influence de la lumière parasite, ajouter un interrupteur,... et grâce à une imprimante 3D, cette version sera monobloc donc bien étanche.

Ainsi nous pourrons par nos mesures répondre à notre problématique.

Par la suite, nous envisageons de partager ces résultats en les publiant sur le site que nous avons créé :

http://laboueeposeidon.free.fr/site_argonautes/accueil.html

Par ailleurs les mairies alentours et associations de pêche par exemple, ainsi qu'un industriel sont intéressé par notre capteur du fait de son faible coût, de sa simplicité d'utilisation et de sa portativité.

SITOGRAPHIE ET PARTENAIRES

Partenaires :

- CNES Toulouse
- Société Tenum à Toulouse : Société d'ingénierie, de télétransmission et de télémétrie
- S2E, Suez environnement : Société des Eaux de l'Essonne
- SIARE 91 : station d'épuration d'Etampes / Morigny-Champigny
- Syndicat de la Juine Syndicat Intercommunal Mixte pour l'Aménagement et l'Entretien de la Rivière La Juine et de ses affluents (SIARJA) / Morigny

Contact et soutien technique :

- Frédéric Bouchar : développeur informatique de la société TENUM
- Danielle De Staerke : Direction de la Communication externe, de l'Education et des affaires publiques - Service Jeunesse et acteurs de l'Education
- Emmanuel Carrier : Responsable de l'agence d'Etampes
- Marc Lebon : Président de la station d'épuration d'Etampes
- Jérôme Gréfeuille : Chargé des rivières au SIARJA.



Internet :

Parmi plusieurs sources :

<http://www.enzyme.wikibis.com/chlorophylle.php>

<http://www.gnis-pedagogie.org/pages/classbio/chap2/7.htm>

http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Master/ue/MV426/fluo89.pdf

Ouvrage :

Détection de chlorophylle, mis à jour en janv. 2012, F. Bouchar

Dossier d'aide à la réalisation d'une bouée expérimentale, nov 2008, F. Bouchar

Annexe 1 : Visite du LAB'EAU de Suez Environnement au Pecq



Dans ces laboratoires, les mesures sont automatisées. Par exemple, pour une mesure de DBO_5 La machine enlève le bouchon rigide, puis la sonde à O_2 est introduite à travers une membrane souple afin de réaliser les mesures dans le flacon en verre contenant l'eau à tester.

Annexe 2 : Visite de la station d'épuration, présentation du projet à nos partenaires (SIARE, SEE, Syndicat de la Juine) en présence de journalistes (Républicain et Etampes info) mais également réalisation de mesures

Lorsque nous sommes arrivés, nous avons tout d'abord présenté notre projet pour que nos partenaires aient une vision assez précise de ce que nous avons fait et ce que nous envisageons de réaliser dans les semaines à venir.



Puis nous sommes revenus à plusieurs reprises pour réaliser des prélèvements et faire des mesures.

